

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к кардиолипину классов IgG и IgM (Anti-Cardiolipin IgG/IgM).

Инструкция пользователя

ЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-Cardiolipin IgG/IgM предназначен для количественного определения IgG и аутоантител к кардиолипину в сыворотке или плазме человека методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro*, и может быть использован при диагностике повышенного риска возникновения тромбоза у пациентов, страдающих системной красной волчанкой (SLE) или другими заболеваниями этой группы.

ОБОЗНАЧЕНИЕ

Кардиолипин (дифосфатидилглицерин) относится к группе отрицательно заряженных фосфолипидов. Антитела к этим фосфолипидам часто (но не обязательно) выполняют роль естественного антикоагулянта - антител, вызывающих удлинение клоттинговых тестов. Антитела к кардиолипину обнаруживаются при различных аутоиммунных заболеваниях. Их присутствие у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) ассоциируется с развитием тромбозов и тромбоцитопений, в гинекологии они являются причиной внутриутробной гибели плода или привычного выкидыша. Антикардиолипиновые антитела также обнаруживаются при нетромботических неврологических расстройствах - таких как цереброваскулярная недостаточность, ишемия мозга, хорей и инфаркт миокарда.

Антитела к кардиолипину могут относиться к классам IgG, IgM и IgA. Обнаружение антител класса IgM является индикатором начинающихся аутоиммунных заболеваний, в то время как антитела класса IgG обнаруживаются при обострении и прогрессировании ранее манифестировавших аутоиммунных процессов. Титры антител к кардиолипину класса IgG хорошо коррелируют с клиническим состоянием пациентов с тромбозом, тромбоцитопенией, хроническим невынашиванием беременности и некоторыми неврологическими расстройствами. Антитела к кардиолипину класса IgA часто обнаруживаются совместно с IgG-антителами. Вероятнее всего, что определение IgA-антител является более информативным в отношении развития тромбоза и угрозы выкидыша.

Большинство заболеваний, связанных с антикардиолипиновыми антителами, - это тромбоз глубоких вен и другие тромботические расстройства. Антитела к кардиолипину обнаруживаются в сыворотке примерно у 60% пациентов с СКВ. Наличие этих антител свидетельствует о высоком риске развития тромбоза и тромбоцитопении.

В гинекологии антитела к кардиолипину являются хорошим прогностическим фактором внутриматочной гибели плода или привычного выкидыша. Рекомендуется плановое определение антител к кардиолипину у беременных с СКВ или тромбозом для оценки риска осложнений беременности. Количественное определение антикардиолипиновых антител, особенно IgG, является высокоспецифичным индикатором эффективности проводимой терапии.

Присутствие антикардиолипиновых антител описывается у пациентов с неврологической патологией. Тромбоз церебральных сосудов может вызывать ишемию мозга. Нетромботические

и ЦНС, например, хорea или эпилепсия, также ассоциируются с наличием кардиолипидных антител.

Показано, что антитела к кардиолипину не обнаруживают корреляции с результатами теста (реакция Вассермана) на сифилис и также не обнаруживают перекрестной реактивности с антителами к ДНК, так как принадлежат к другому типу антител.

Последние исследования обнаружили, что для связывания антител к кардиолипину с антигеном требуется сывороточный кофактор - β 2-гликопротеин I (аполипопротеин II), который представляет собой β 2-глобулин с молекулярной массой 50 кД, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. Гликопротеин I *in vivo* ассоциирован с липопротеинами, отрицательно заряженными липидами, тромбоцитами и митохондриями. Найдено, что β 2-гликопротеин I ингибирует внешний путь свертывания и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Таким образом, предполагается участие β 2-гликопротеина I в регуляции свертывания крови.

Наличие β 2-гликопротеина I является необходимым условием связывания антител к кардиолипину с кардиолипином. Антикардиолипидные антитела распознают как сам кардиолипид, так и комплекс с β 2-гликопротеином I.

Для ИФА-тестов необходимая концентрация β 2-гликопротеина I создается добавлением очищенного β 2-гликопротеина I в лунки микропланшета, что обеспечивает качество и воспроизводимость получаемых результатов.

Показания для исследования антител к кардиолипину:

Системная красная волчанка	- Хорea
Тромбозы	- Эпилепсия
Тромбоцитопения	- Внутриматочная гибель плода
Ишемия мозга	- Привычное невынашивание беременности

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным бычьим кардиолипином. Антитела к кардиолипину требуют в качестве кофактора β 2-гликопротеин I, поэтому ячейки насыщены высокоочищенным человеческим β 2-гликопротеином I. Присутствующие в разведенной сыворотке антитела к этим антигенам связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. При промывке удаляются все не связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке.

Антитела к IgG и IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, иммунологически связываются со связавшимися в лунках антителами из сывороток пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуетсa с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты, при этом раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG и IgM антител, присутствующих в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены только для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. 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.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим соляную кислоту (1M). Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) — это вещество, токсичное и активное в чистом виде. Однако концентрации, содержащиеся в поставляемых реагентах, не

...являют опасности. Несмотря на то, что они считаются не опасными, производитель рекомендует
...соответствующие предосторожности при работе с реагентами (см. п.п. 8, 9, 10)
...которые компоненты набора содержат Proclin 300 а в качестве консерванта. При утилизации
...содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большим количеством воды,
...разветви компоненты ниже активных уровней.
...обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте

...пипетируйте ртом

...помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

...не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами;
...пониженная температура может вызывать спонтанное возгорание.

...смотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте
...становках контроля и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора,
...контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

СОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным человеческим кардиолипином и насыщенных высокоочищенным человеческим $\beta 2$ -гликопротеином I. Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы с антителами к кардиолипину классов IgG и IgM (A-F) в сывороточно/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), содержащие: IgG: 0; 7.5; 15; 30; 60; 120 GPL Ед/мл и IgM: 0 , 5; 10; 20; 40; 80 MPL Ед/мл Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к кардиолипину классов G, M в сывороточно/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), содержащие позитивный Контроль (1) и негативный Контроль (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5х.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный) (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие анти-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный) (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие анти-IgM антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат 50х	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C

микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.

реактивы стабильны вплоть до истечения срока годности.

Храните компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами света, не позволяйте реагентам нагреваться.

Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм

Многоканальный дозатор или диспенсер на 100 мкл

Портекс

Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Таймер

Программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

Дистиллированная вода

Измерные цилиндры на 100 и 1000 мл

Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

БОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

рации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного буфера

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

- Приготовление образцов
- Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.
- Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных проб сывороток пациентов в дублях.
2. Добавьте в соответствующие ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов в дублях.

	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 пациентов 1,2...

C1 – положительный контроль

C2 – отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28 °C).

4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.

6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.

9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.

11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Cardiolipin IgG/IgM ELISA может быть использована с автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм негативного контроля (1), позитивного контроля (2) и калибраторов (A-F) полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации гладким сплайном.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgG к кардиолипину. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (С)									
No	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср едн ее	Ко нц 1 яч.	Ко нц 2 яч.	Ср едн ее	Заяв л. Кон ц.	CV %
ST A	A 1/B 1	0.050	0.050	0.050	0.1	0.1	0.1	0.0	0
ST B	C 1/D 1	0.322	0.300	0.311	7.8	7.0	7.4	7.5	7
ST C	E 1/F 1	0.520	0.519	0.520	15.2	15.2	15.2	15.0	0
ST D	G 1/H 1	0.803	0.824	0.814	29.2	30.5	29.9	30.0	3
ST E	A 2/B 2	1.226	1.191	1.209	61.6	58.2	59.9	60.0	3
ST F	C 2/D 2	1.640	1.637	1.638	120.5	119.9	120.2	120.0	0

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

исследовании диапазона нормальных значений антител к кардиолипину в сыворотках здоровых
 ов получены следующие значения:

	Антитела к кардио- липину IgG [Ед/мл]	Антитела к кардио-липину IgM [Ед/мл]
малый уровень	<10	<7
высокий уровень	≥10	≥7

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического
 исследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.
 Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и
 патологии антител к гистонам.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией IgG- и IgM-антител к кардиолипину были разведены буфером для
 образцов и проанализированы.

Анти- тел а	Образ- ец	Разве- дение	Наблю- даемо- е [Ед/мл]	Ожи- да- емое [Ед/ мл]	% извле- чени- я
IgG	1	1:200	126.7		
		1:400	63.7	63.4	100
		1:800	32.9	31.7	104
		1:1600	14.1	15.8	89 %
		1:3200	7.2	7.9	91 %
IgG	2	1:100	112.3		
		1:200	56.1	56.2	100
		1:400	25.0	28.1	89 %
		1:800	12.0	14.0	86 %
		1:1600	6.0	7.0	86 %
IgM	3	1:100	55.0		
		1:200	27.0	27.5	98 %
		1:400	13.0	13.8	94 %
		1:800	6.4	6.9	93 %
IgM	4	1:200	46.5		
		1:400	23.2	23.3	100
		1:800	10.9	11.6	94 %
		1:1600	5.2	5.8	90 %
		1:3200	2.8	2.9	97 %

Производительность

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех наборов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводительность между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Антикардиолипин IgG			Антикардиолипин IgM		
внутри серии			внутри серии		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]	Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	29.1	5.4	1	8.4	3.7
2	62.5	5.8	2	40.1	4.5
3	109.4	4.1	3	58.6	5.3

Антикардиолипин IgG			Антикардиолипин IgM		
между сериями			между сериями		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]	Обра-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	32.9	3.8	1	10.3	3.4
2	70.9	2.5	2	47.0	3.3
3	118.3	2.7	3	79.1	2.5

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к кардиолипину класса IgG – 1,0 GPL Ед/мл и IgM – 0,5 MPL Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт очищенным кардиолипином и насыщен человеческим β 2-гликопротеином I. Специальный процесс нанесения, разработанный производителем, гарантирует сохранение нативной иммуногенной структуры кардиолипина после иммобилизации на твердой фазе. Данный метод ИФА специфическим выявляет антитела к кардиолипину или комплексам отрицательно заряженных кардиолипина и β 2-гликопротеина I. Не наблюдалось перекрестной реактивности с анти-ДНА антителами и антителами, присутствующими при сифилисе.

КАЛИБРОВКА

Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Louisville, США, и IgG специфичному референсному материалу IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Cardiolipin IgG/IgM ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

ЭМА ИНКУБАЦИИ

Иммуноанализ на антитела к кардиолипину (IgG и IgM)

Добавить
100 μ л контролей в
микроячейки

Контроли
100 μ л проб пациента

☐

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

Выдержать 5 минут и Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ " ____ 20 ____ года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ОАО "БиоХимМак"

Гамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения
антител к кардиолипину классов IgA (Anti-Cardiolipin IgA).

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-Cardiolipin IgA предназначен для количественного определения IgA-антител к кардиолипину в сыворотке или плазме человека методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro*, и может использоваться при диагностике повышенного риска возникновения тромбоза у пациентов, имеющих системную красную волчанку (SLE) или другими заболеваниями этой группы.

ОБЩЕЕ СВЕДЕНИЕ

Кардиолипин (дифосфатидилглицерин) относится к группе отрицательно заряженных липидов. Антитела к этим фосфолипидам часто (но не обязательно) выполняют роль естественного антикоагулянта - антител, вызывающих удлинение клоттинговых тестов. Антитела к кардиолипину обнаруживаются при различных аутоиммунных заболеваниях. Их присутствие у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) ассоциируется с развитием тромбозов и тромбоцитопений, в гинекологии они являются причиной внутриутробной гибели плода или раннего выкидыша. Антикардиолипиновые антитела также обнаруживаются при нетромботических неврологических расстройствах - таких как цереброваскулярная недостаточность, ишемия мозга, хорея Гангленга и др.

Антитела к кардиолипину могут относиться к классам IgG, IgM и IgA. Обнаружение антител класса IgM является индикатором начинающихся аутоиммунных заболеваний, в то время как антитела класса IgG обнаруживаются при обострении и прогрессировании ранее манифестировавших аутоиммунных процессов. Титры антител к кардиолипину класса IgG хорошо коррелируют с клиническим состоянием пациентов с тромбозом, тромбоцитопенией,

хроническим невынашиванием беременности и некоторыми неврологическими расстройствами. Антитела к кардиолипину класса IgA часто обнаруживаются совместно с IgG-антителами. Вероятнее всего, что определение IgA-антител является более информативным в отношении развития тромбоза и угрозы выкидыша.

Большинство заболеваний, связанных с антикардиолипиновыми антителами, - это тромбоз глубоких вен и другие тромботические расстройства. Антитела к кардиолипину обнаруживаются в сыворотке примерно у 60% пациентов с СКВ. Наличие этих антител свидетельствует о высоком риске развития тромбоэмболии и тромбоцитопении.

В гинекологии антитела к кардиолипину являются хорошим прогностическим фактором внутриматочной гибели плода или привычного выкидыша. Рекомендуется плановое определение антител к кардиолипину у беременных с СКВ или тромбозом для оценки риска осложнений беременности. Количественное определение антикардиолипиновых антител, особенно IgG, является высокоспецифичным индикатором эффективности проводимой терапии.

Присутствие антикардиолипиновых антител описывается у пациентов с неврологической патологией. Тромбоз церебральных сосудов может вызывать ишемию мозга. Нетромботические

Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) – это вещество, токсичное и активное в чистом виде. Однако концентрации, содержащиеся в поставляемых реагентах, не представляют опасности. Несмотря на то, что они считаются не опасными, производитель рекомендует соблюдать соответствующие предосторожности при работе с реагентами (см. п.п. 8, 9, 10)

Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 а в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большим количеством воды, чтобы развести компоненты ниже активных уровней.

При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

Не пипетируйте ртом

В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте постановки контроля и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным человеческим кардиолипином и насыщенным высокоочищенным человеческим β_2 -гликопротеином I.). Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы с антителами к кардиолипину классов IgA (A-F) в сывороточно/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)), содержащие: IgA: 0; 7.5; 15; 30; 60; 120 APL Ед/мл Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к кардиолипину классов А в сывороточно/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)), содержащие позитивный Контроль (1) и негативный Контроль (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN_3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5х.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный) (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие анти-IgA антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN_3 <0,1% (w/w)), концентрат 50х	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.

введенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- многоканальный дозатор или диспенсер на 100 мкл
- пипет
- пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- таймер
- программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Добавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного буфера

Добавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных проб сывороток пациентов в дублях.
2. Добавьте в соответствующие ячейки по **100 мкл** стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов.

	1	2	3	4	5	6
a	KA	P1	P5			
b	KA	P1	P5			
c	KB	P2	P..			
d	KB	P2	P..			
e	KC	P3				
f	KC	P3				
g	KD	P4				
h	KD	P4				

3. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и **трижды промойте 300 мкл** промывочного раствора.
 5. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и **трижды промойте 300 мкл** промывочного раствора.
 8. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
 10. Добавьте **100 мкл** стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Cardiolipin IgA ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм негативного контроля (1), негативного контроля (2) и калибраторов (A-F) полностью совпадают с соответствующими значениями, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации гладким сплайном.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgA к кардиолипину. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (С)									
No	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср едн ее	Ко нц 1 яч.	Ко нц 2 яч.	Ср едн ее	Заяв л. Кон ц.	С V %
ST A	A 1/B 1	0.05 0	0.0 50	0.0 50	0.1	0.1	0.1	0.0	0
ST B	C 1/D 1	0.32 2	0.3 00	0.3 11	7.8	7.0	7.4	7.5	7
ST C	E 1/F 1	0.52 0	0.5 19	0.5 20	15. 2	15. 2	15. 2	15.0	0
ST D	G 1/H 1	0.80 3	0.8 24	0.8 14	29. 2	30. 5	29. 9	30.0	3
ST E	A 2/B 2	1.22 6	1.1 91	1.2 09	61. 6	58. 2	59. 9	60.0	3
ST F	C 2/D 2	1.64 0	1.6 37	1.6 38	120 .5	119 .9	120 .2	120. 0	0

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к кардиолипину в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к кардио- липину IgA [Ед/мл]
нормаль- ный уровень	<10
повыше- нный уровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического исследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к гистонам.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией IgA-антител к кардиолипину были разведены буфером для образцов и проанализированы.

Ант и- тел а	Образ ец	Разве- дение	Набл ю- даемо е [Ед/мл]	Ожи да- емое [Ед/ мл]	% извле- - чени я
IgA	1	1:200	1202		
		1:400	599	601	100
		1:800	287	301	95 %
		1:1600	144	150	96 %
		1:3200	73	75	97 %
IgA	2	1:100	1122		
		1:200	557	562	99 %
		1:400	261	281	93 %
		1:800	126	140	90 %
		1:1600	62	70	89 %

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Антикардиолипи н IgA
Внутри серии

Антикардиолипин IgA
внутри серии

Сред нее [Ед/м л]	CV [%]
11.9	5.9
40.0	4.0
82.7	4.1

Обр а-зец No	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]
1	9.7	3.3
2	37.6	3.9
3	97.9	3.3

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к кардиолипину класса IgA – 1,0 APL Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт очищенным кардиолипином и насыщен человеческим β 2-гликопротеином I. Специальный процесс нанесения, разработанный производителем, гарантирует сохранение нативной иммуногенной структуры кардиолипина после иммобилизации на твердой фазе. Данный метод ИФА специфически выявляет антитела к кардиолипину или комплексам отрицательно заряженных кардиолипина и β 2-гликопротеина I. Не наблюдалось перекрестной реактивности с анти-ДНА антителами и антителами, присутствующими при сифилисе.

Калибровка

Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Louisville, США, поскольку не существует другого международного стандарта.

Ограничения метода

Тест-система ORGENTEC Anti-Cardiolipin IgA ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

Влияющие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов.

Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Суммарные антитела к кардиолипину (IgA)

Добавить
100 μ л контролей в
микроячейки

Контроли
100 μ л проб пациента

☐ Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

☐ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

☐

бубировать **15 минут** при комнатной температуре

лить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить **100 μ л** раствора субстрата ТМБ

бубировать **15 минут** при комнатной температуре

Добавить **100 μ л** стоп-раствора

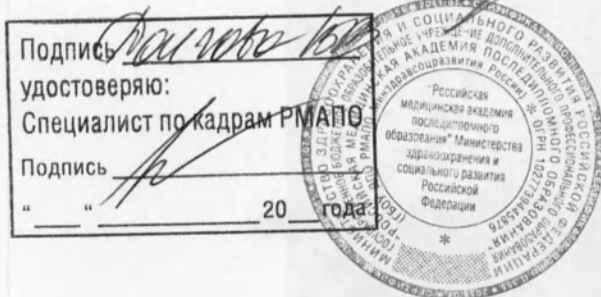
удержать **5 минут** и Считать при **450 нм**

СОГЛАСОВАНО»

ав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » _____ 2011г.

Всего прошито
и пронумеровано

9 листов

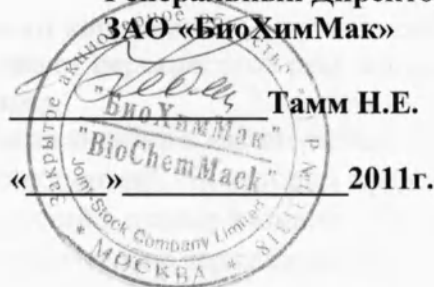
Генеральный Директор
ЗАО "БиоХимМак"
Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения суммарных антител к кардиолипину классов IgG, IgM и IgA (Anti-Cardiolipin Screen).

Инструкция пользователя

НАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-Cardiolipin Screen предназначен для количественного определения IgG, IgM и IgA антител к кардиолипину в сыворотке или плазме человека методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro*, и может использоваться при диагностике повышенного риска возникновения тромбоза у пациентов, страдающих системной красной волчанкой (SLE) или другими заболеваниями этой группы.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Кардиолипин (дифосфатидилглицерин) относится к группе отрицательно заряженных липидов. Антитела к этим фосфолипидам часто (но не обязательно) выполняют роль естественного антикоагулянта - антител, вызывающих удлинение клоттинговых тестов. Антитела к кардиолипину обнаруживаются при различных аутоиммунных заболеваниях. Их присутствие у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) ассоциируется с развитием тромбозов и тромбоцитопений, в гинекологии они являются причиной внутриутробной гибели плода или привычного выкидыша. Антикардиолипиновые антитела также обнаруживаются при нетромботических гематологических расстройствах - таких как цереброваскулярная недостаточность, ишемия мозга, хорея Ардженто-Риза.

Антитела к кардиолипину могут относиться к классам IgG, IgM и IgA. Обнаружение антител класса IgM является индикатором начинающихся аутоиммунных заболеваний, в то время как антитела класса IgG обнаруживаются при обострении и прогрессировании ранее манифестировавших аутоиммунных процессов. Титры антител к кардиолипину класса IgG хорошо коррелируют с клиническим состоянием пациентов с тромбозом, тромбоцитопенией, хроническим невынашиванием беременности и некоторыми неврологическими расстройствами. Антитела к кардиолипину класса IgA часто обнаруживаются совместно с IgG-антителами. Вероятнее всего, что определение IgA-антител является более информативным в отношении развития тромбоза и угрозы выкидыша. Большинство заболеваний, связанных с антикардиолипиновыми антителами, - это тромбоз глубоких вен и другие тромботические расстройства. Антитела к кардиолипину обнаруживаются в сыворотке примерно у 60% пациентов с СКВ. Наличие этих антител свидетельствует о высоком риске развития тромбоэмболии и тромбоцитопении.

В гинекологии антитела к кардиолипину являются хорошим прогностическим фактором внутриматочной гибели плода или привычного выкидыша. Рекомендуется плановое определение антител к кардиолипину у беременных с СКВ или тромбозом для оценки риска осложнений беременности. Количественное определение антикардиолипиновых антител, особенно IgG, является высокоспецифичным индикатором эффективности проводимой терапии.

Присутствие антикардиолипиновых антител описывается у пациентов с неврологической патологией. Тромбоз церебральных сосудов может вызывать ишемию мозга. Нетромботические

патологии ЦНС, например, хорей или эпилепсия, также ассоциируются с наличием антикардиолипидных антител.

Показано, что антитела к кардиолипину не обнаруживают корреляции с результатами теста VDRL (реакция Вассермана) на сифилис и также не обнаруживают перекрестной реактивности с антителами к ДНК, так как принадлежат к другому типу антител.

Последние исследования обнаружили, что для связывания антител к кардиолипину с антигеном требуется сывороточный кофактор - β 2-гликопротеин I (аполипопротеин H), который представляет собой β 2-глобулин с молекулярной массой 50 кД, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. β 2-гликопротеин I *in vivo* ассоциирован с липопротеинами, отрицательно заряженными фосфолипидами, тромбоцитами и митохондриями. Найдено, что β 2-гликопротеин I ингибирует внутренний путь свертывания и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Таким образом, предполагается участие β 2-гликопротеина I в регуляции свертывания крови.

Наличие β 2-гликопротеина I является необходимым условием связывания антител к кардиолипину с кардиолипином. Антикардиолипидные антитела распознают как сам кардиолипид, так и его комплекс с β 2-гликопротеином I.

Для ИФА-тестов необходимая концентрация β 2-гликопротеина I создается добавлением очищенного β 2-гликопротеина I в лунки микропланшета, что обеспечивает качество и воспроизводимость получаемых результатов.

Показания для исследования антител к кардиолипину:

- | | |
|------------------------------|--|
| - Системная красная волчанка | - Хорей |
| - Тромбозы | - Эпилепсия |
| - Тромбоцитопения | - Внутриматочная гибель плода |
| - Ишемия мозга | - Привычное невынашивание беременности |

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным бычьим кардиолипином. Антитела к кардиолипину требуют в качестве кофактора β 2-гликопротеин I, поэтому ячейки насыщены высокоочищенным человеческим β 2-гликопротеином I. Присутствующие в разведенной сыворотке антитела к этим антигенам связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. При промывке удаляются все не связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке.

Антитела к IgG, IgM и IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, иммунологически связываются со связавшимися в лунках антителами из сывороток пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуется с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты, при этом раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG, IgM и IgA антител, присутствующих в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены только для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. 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.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) – это вещество, токсичное и активное в чистом виде. Однако концентрации, содержащиеся в поставляемых реагентах, не

представляют опасности. Несмотря на то, что они считаются не опасными, производитель рекомендует соблюдать соответствующие предосторожности при работе с реагентами (см. п.п. 8, 9, 10).
Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большим количеством воды, чтобы разветви компоненты ниже активных уровней.

При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

Не пипетируйте ртом

В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным человеческим кардиолипином и насыщенным высокоочищенным человеческим β 2-гликопротеином I.). Готов к использованию.	1
Контроли антител к кардиолипину классов G, M, A в сывороточно/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), содержащие Негативный Контроль (A) 3.3 Е/мл Cut-Off Контроль (B) 10 Е/мл Позитивный Контроль (C), 30 Е/мл Сильно Позитивный Контроль (D), 90 Е/мл. Готовы к использованию.	4 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5х.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный) (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), содержащий смесь поликлональных кроличьих античеловеческих анти-IgG-IgG, анти-IgM-IgG, анти-IgA-IgG антител, меченых пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат 50х	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
многоканальный дозатор или диспенсер на 100 мкл
ортекс
пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
таймер
Программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

дистиллированная вода
темные цилиндры на 100 и 1000 мл
пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

БОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным.

р стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

готовление промывочного буфера

Слейте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной воды до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

готовление образцов

Внесите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием.

Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке.

Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных проб сывороток пациентов в дублях.

Добавьте в соответствующие ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов.

	1	2	3	4	5	6
a	KA	P1	P5			
b	KA	P1	P5			
c	KB	P2	P..			
d	KB	P2	P..			
e	KC	P3				
f	KC	P3				
g	KD	P4				
h	KD	P4				

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Cardiolipin Screen ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм негативного контроля (A) Cut-Off контроля (B), позитивного контроля (C) и сильно позитивного контроля (D) полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РЕЗУЛЬТАТОВ

счета результатов данного теста рекомендуется непосредственное сравнение оптической плотности образца каждого пациента с оптической плотностью контролей. Образцы с оптической плотностью выше, чем оптическая плотность контроля cut-off, считаются положительными.

Отрицательный: ОП пациента < ОП cut-off контроля

Положительный: ОП пациента > ОП cut-off контроля

Сильноположительный: ОП пациента $\geq$ ОП сильноположительного контроля

Полуколичественного расчета результатов теста могут быть использованы концентрации и результаты измерения ОП контролей, которые используются для построения калибровочной кривой (рекомендуемая кривая - 4-параметрическая в полулогарифмических координатах). Концентрации известных образцов рассчитываются по калибровочной кривой.

При положительном результате в скрининговом тесте дальнейшее типирование аутоантител к кардиолипину должно проводиться с использованием наборов для количественного определения антител классов IgG, IgM и IgA.

Данный набор определяет сумму аутоантител всех трех классов (IgG, IgM и IgA). Образцы пациентов, содержащие 2 или 3 класса аутоантител к кардиолипину в низких концентрациях могут быть положительными в данном скрининговом тесте благодаря суммирующему эффекту. Такие образцы могут оказаться отрицательными при исследовании на отдельные классы аутоантител (IgG, IgM и IgA).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к кардиолипину в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

Антитела к кардиолипину

Cut-Off: 10 Ед/мл

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к кардиолипину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки содержащие антитела к кардиолипину классов IgG, IgM и IgA были разведены буфером для образцов и проанализированы с использованием данного набора.

Антите ла	Обр а- зец	Разве - дени е	Наблю - даемо е [Ед/мл]	Ожида - емое [Ед/мл]	Н/О
Скрини нг	1	1:200	47.7		
		1:400	24.0	23.9	100 %
		1:800	11.5	11.9	97 %

		1:160 0	6.0	6.0	100 %
		1:320 0	2.7	3.0	90 %
рини	2	1:100	138.0		
		1:200	69.7	69.0	101 %
		1:400	33.5	34.5	97 %
		1:800	15.9	17.3	92 %
		1:160 0	7.8	8.6	91 %
		1:320 0	4.1	4.3	95 %

воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из четырех образцов в 22 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			между сериями		
Обр а- зец No	Средне е [Ед/мл]	CV [%]	Обр а- зец No	Средн ее [Ед/м л]	CV [%]
1	4.4	13.3	1	5.8	12.4
2	14.8	5.2	2	15.8	8.1
3	42.1	4.1	3	43.7	4.7
4	70.2	6.6	4	75.9	2.5

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт очищенным кардиолипином и насыщен человеческим $\beta 2$ -гликопротеином I. Специальный процесс нанесения, разработанный производителем, гарантирует сохранение нативной иммуногенной структуры кардиолипина после иммобилизации на твердой фазе. Данный метод ИФА специфическим выявляет антитела к кардиолипину или комплексам отрицательно заряженных кардиолипина и $\beta 2$ -гликопротеина I. Не наблюдалось перекрестной реактивности с анти-ДНА, антителами и антителами, присутствующими при сифилисе.

КАЛИБРОВКА

Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Louisville, США, и IgG специфичный референсному материалу IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Histone ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 1000 мг/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

ЭМА ИНКУБАЦИИ

Иммуноанализ на антитела к кардиолипину (IgG+IgM+IgA)

Добавить
100 μ л
микроячейки
контролей в

Контроли
100 μ л проб пациента

☐

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

Выдержать 5 минут и Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ " ____ 20 ____ года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011г.

Всего прошито
и пронумеровано
8 листов

Генеральный Директор
ЗАО "БиоХимМак"
Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения анти-митохондриальных M2 антител (АМА-M2)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC ama-m2 предназначен для количественного определения аутоантител классов против митохондриального антигена M2 субтипа. Этот метод предназначен для диагностики in vitro ска тромбоза и привычной потери плода.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Анти-митохондриальные антитела (АМА) - гетерогенная группа аутоантител против различных классов, расположенных на внутренней и внешней мембране митохондрии. Их основные антигены находятся в тканях. Кроме неорганоспецифичных субтипов антител описаны антитела проявляющие высокую органоспецифичность.

При использовании флуоресцентной техники на срезах различных органов, а именно, печени, поджелудочной железы, митохондриальные аутоантитела могут распознаваться с различной специфичностью. Для некоторых АМА субтипов их специфический белок-мишень остается еще неизвестным. Специфические анти-митохондриальные антитела описаны для первичного билиарного цирроза как субтипы M2, M4, M8 и M9. Другие АМА субтипы связаны с другими болезнями, такими как коллагенозы (АМА-M5), лекарственной красной волчанкой и гепатитами (АМА-M3 и АМА-M6).

Гетерогенно реагирующие специфические анти-митохондриальные антитела M2 субтипа направлены против трех связанных белков α -кетодегидрогеназного комплекса, расположенного на внутренней митохондриальной мембране. Основным эпитопом является расположенный на E2 субъединице и протеине X пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК).

Кроме того, АМА-M2 аутоантитела распознают E1 α и E1 β субъединицы этого комплекса и E2 субъединицу нескольких других мультиферментных комплексов, таких как 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса и дегидрогеназного комплекса 2-оксоисovalerate с разветвленной цепью.

При использовании метода непрямой иммунофлуоресценции с монослоем клеток линии Нер 2 АМА-M2 аутоантитела идентифицируются с мелко-крупчатым цитоплазматическим, перинуклеарным конденсированным свечением.

Определение АМА-M2 с помощью иммуноферментного анализа рекомендуется для дифференциального диагноза первичного билиарного цирроза (ПБЦ), так как этот метод очень высокочувствительный и специфичный.

У пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями определение АМА аутоантител позволяет проводить ранний скрининг для определения субтипов M2 и M9 антител, которые могут быть связаны с развитием и/или с ассоциированными заболеваниями ПБЦ.

Профиль АМА субтипов позволяет провести иммунологическую и прогностическую классификацию первичного билиарного цирроза. Первые симптомы ПБЦ часто связаны только с появлением АМА-M2 антител (иногда в комбинации с АМА-M9), тогда как прогрессивное течение

лезни и смешанные синдромы с хроническими активными гепатитами связаны с появлением АМА-2, -М4 и -М8 субтипов антител.

АМА субтип	Ауто-антигены	Локализация	Клиническое значение
М1	кардиолипиды	внутренняя часть митохондриальной мембраны	сифилис-П
М2	белки α -кетодегидрогеназного комплекса	внутренняя часть митохондриальной мембраны	первичный билиарный цирроз (ПБЦ)
М3		наружная часть митохондриальной мембраны	лекарственная красная волчанка (пиразолон)
М4	ассоциированы с сульфитоксидазой	наружная часть митохондриальной мембраны	ПБЦ
М5		наружная часть митохондриальной мембраны	системная красная волчанка и недифференцированные коллагенозы, аутоиммунная гемолитическая анемия
М6		наружная часть митохондриальной мембраны	лекарственные токсические гепатиты (ипрониазид)
М7	саркозиндегидрогеназа	внутренняя часть митохондриальной мембраны	кардио-миопатия, миокардиты
М8		наружная часть митохондриальной мембраны	ПБЦ
М9	ассоциированы с гликогенфосфорилазой	наружная часть митохондриальной мембраны (вероятно, также цитоплазматическая)	ПБЦ

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для количественного измерения антител класса IgG против митохондриального антигена М2 субтипа. Микроячейки покрыты митохондриальным М2-антигеном.

Планшет может быть разделен на 12 стрипов по 8 ячеек каждый или может быть использован сразу для 96 определений. Каждая ячейка может быть отделена от стрипа ("break-away").

В ходе анализа проходят связывание аналита, образование сэндвичего комплекса и ферментная цветная реакция в следующих фазах реакции:

Фаза 1:

Стандарты, контроли и предварительно разбавленные пробы сыворотки пациентов вносятся в микроячейки. Присутствующие антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. После 30-минутной инкубации ячейки промываются, при этом промывочный раствор удаляет несвязавшиеся компоненты сыворотки.

Фаза 2:

Раствор конъюгата анти-человечьего-IgG-пероксидаза хрена добавляется в ячейки для определения антител, связанных с иммобилизованными антигенами. После 15-минутной инкубации несвязавшийся ферментный конъюгат удаляется промывочным буфером.

Фаза 3:

Хромогенный раствор субстрата, содержащий ТМБ, добавляется в ячейки. В течение 15-минутной инкубации цвет раствора становится голубым. Развитие окраски останавливается добавлением раствора фосфорной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце. Строится график зависимости оптической плотности каждого калибратора от концентрации IgG, и концентрация неизвестных образцов экстраполируется из него.

Требуется считать оптическую плотность при 450 нм. Рекомендуется бихроматический режим с фильтром сравнения 600 - 650 нм.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора 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 крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для разбавления образцов и промывочный буферный раствор) содержат азид натрия в качестве консервантов. Азид натрия (NaN_3) высоко токсичное и активное в чистом виде вещество. В той концентрации, в которой он находится в компонентах набора, он не опасен. Несмотря на это производители набора настоятельно рекомендуют с осторожностью использовать набор (пп 7,8,9)
- Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При смыве в канализацию рекомендуется разбавлять отходы большим количеством воды для снижения активного уровня.
- Во время работы пользуйтесь одноразовыми перчатками и тщательно мойте руки после работы.
- Не отбирайте образцы ртом
- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить и пользоваться косметикой.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях для использования контролей и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови следуйте локальным юридическим руководствам.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным митохондриальным антигеном субтипа М2. Готов к использованию.	1
Калибраторы АМА-М2 в сывороточно/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), содержащие: 0; 12,5; 25; 50; 100 и 200 МЕ/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов по 1,5 мл каждый

контроли АМА-M2 в сывороточно/буферном матриксе фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$, положительный и отрицательный), см. вкладыш со значениями. Готов к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
буфер образцов (Tris , $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), желтый, концентрат (5x)	1 флакон 20 мл
раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, $\text{POCLIN 300} < 0,5\%(\text{v/v})$), (светло-красный), содержащий моноклональные кроличьи анти-человеческие IgG-IgG антитела, очищенные пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

- Хранить при 2 - 8 °С
- Ячейки микропланшета хранятся в пакете с осушителем
- Компоненты набора стабильны до срока годности, указанного на этикетках.
- Беречь реагенты от воздействия тепла, солнца и яркого света при хранении и использовании.
- Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °С

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер
- Лабораторный таймер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Вортекс
- программное обеспечение для ридера

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование дезактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ по выполнению анализа

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°C).
- Подготовьте все реагенты и образцы перед началом работы. Начав работать, выполняйте все шаги анализа без задержек для получения надежных и воспроизводимых результатов.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеразбавленные образцы.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Избегайте контаминации переносом образца в соседние ячейки – используйте одноразовые наконечники для каждого образца и реагента.
- Качественная промывка принципиальна для результата анализа, удаляйте оставшиеся капли полностью после промывки.
- Точно соблюдайте длительность инкубаций
- Контрольные образцы или пулированные сыворотки анализируйте как неизвестные для проверки работы реагентов и выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Используйте эти значения для построения калибровочной кривой, если хотите рассчитать результаты полуколичественно

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.
- Приготовление буферного промывочного раствора
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.
- Приготовление образцов
- Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.
2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от A до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль;
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			

f	S	C1	P3		
	C				
g	S	C2	P4		
	D				
h	S	C2	P4		
	D				

- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28 °C).
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
9. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется хроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
- Считайте оптическую плотность за это время.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест считается валидным при условии, что измеренные величины оптической плотности при 450 нм отрицательного и положительного контролей согласуются с диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, вложенном в набор. Если критерии не выполняются, результаты анализа считаются недостоверными, и анализ необходимо повторить.

Расчет результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации и log-log координаты.

Для ручного расчета рекомендуется линейно-логарифмическая миллиметровая бумага.

Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровую бумагу и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Лаборатории										
	Поз	И-ци	ОП 1	ОП 2	Ср.зн ачени е	Кон ц 1	Конц 2	Сред- нее	Ожид. конц	CV %
A	A	1/1	0,013	0,011	0,012	0,1	0,1	0,0	0,0	12
B	C	1/1	0,437	0,422	0,430	12,9	12,4	12,6	12,5	2
TC	E	1/1	0,741	0,720	0,731	25	24	25	25	2
STD	G	1/1	1,174	1,148	1,161	50	48	49	50	2
STE	A	2/2	1,700	1,701	1,701	102	103	102	100	0
STF	C	2/2	2,173	2,143	2,158	202	193	197	200	1

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При изучении образцов сыворотки здоровых доноров крови был установлен следующий диапазон нормальных значений для набора AMA-M2:

	АМА-М2 [МЕ/мл]
нормальные:	< 10
повышенные:	≥ 10

Положительные результаты должны быть выверены относительно полной картины клинического статуса пациента. Также каждое терапевтическое решение должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии сывороточных наборов АМА-М2.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы набором АМА-М2. Доказана линейность во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Воспроизводимость была рассчитана для каждого из трех образцов в 24 определениях в одиночном опыте для каждой воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных анализов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			Между сериями		
Образец	Среднее [Ед/мл]	CV [%]	Образец №	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	39.8	7.0	1	40.1	6.2
2	81.3	3.8	2	84.6	11.8
3	177.3	3.6	3	180.4	3.8

Чувствительность

Минимально детектируемый предел для антител АМА-M2 - 1 МЕ/мл.

Специфичность

Ячейки микропланшета покрыты высокоочищенным митохондриальным антигеном субтипа М2. Обнаружено, что набор АМА-M2 специфичен только к аутоантителам, специфичным для белков дегидрогеназного комплекса α -кето кислот. Никаких перекрестных реакций к другим митохондриальным аутоантигенам не наблюдалось.

Калибровка

Тест-система прокалибрована по стандарту ВОЗ 67/183 при 100 МЕ/мл.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC AMA-M2 ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,
ЗАО "БиоХимМак"
тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
факс (095) 939-09-97
E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

АМА-M2

Добавить
100 μ л калибраторов
в ячейки

Добавить
100 μ л контролей или
проб пациентов
в ячейки

инкубировать 30 минут при комнатной температуре

сливать содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μ л промывочного буфера

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

инкубировать 15 минут при комнатной температуре

сливать содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μ л промывочного буфера

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

Дать постоять в течение 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«__» _____ 2011г.

Всего прошито

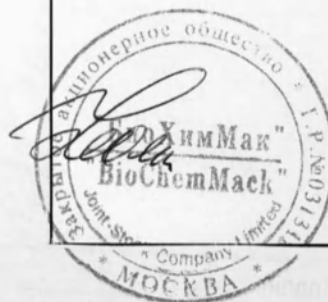
и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к бычьему, свиному и рекомбинантному человеческому инсулину в сыворотке или плазме Anti-Insulin

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC Anti-INSULIN предназначен для количественного измерения антител класса IgG к инсулину в образцах человеческой сыворотки или плазмы методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Этот метод предназначен для диагностики in vitro диабета I типа.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Диабет I типа в основном характеризуется ограничением или полным отсутствием секреции инсулина. Морфологические исследования показали деструкцию бета клеток, называемых также клетками островков Лангерганса у больных диабетом I типа. В многочисленных исследованиях описано появление антител против островковых клеток и инсулина как основная причина заболевания.

Антиинсулиновые антитела определяются у 37% пациентов с впервые выявленным диабетом I типа, у 4% из них - первая степень, и 1,5% положительных результатов - это контрольная группа здоровых лиц. Сообщалось о положительной корреляции между появлением антител к инсулину и антител к островковым клеткам.

Антиинсулиновые антитела могут быть определены за несколько месяцев, а в некоторых случаях и за несколько лет до клинической манифестации заболевания. В редких случаях могут появиться антитела к проинсулину.

Эти "истинные" антитела к эндогенному инсулину следует отличать от тех антител, которые есть у инсулинзависимых диабетиков при терапии инсулином животного происхождения.

В этом случае появление антител - более позднее по времени событие - побочный эффект терапии инсулином. Эти побочные эффекты могут наблюдаться в виде локальной реакции кожи на появившиеся инсулинспецифические антитела. Эти антитела вызывают образование депозитов инсулина и могут быть причиной появления резистентности к терапии животным инсулином.

Сообщалось и о других иммунологических феноменах у диабетиков I типа. У этих пациентов определялись также антитела других специфичностей, но они не могут быть дополнительной причиной аутоиммунной инсулиновой недостаточности.

Таблица, приведенная ниже, показывает процент выявления различных антител у диабетиков I типа по сравнению со здоровыми пациентами:

Специфичность антител	Пациенты с диабетом I типа, (%)	Здоровые пациенты (%)
Антитела к анти-островковым клеткам	32	1
Антитела против поверхностного антигена островковых клеток	~50	~2
Антитела к инсулину	до 70	0
Антитела к тиреоидной пероксидазе	18	6
Антитела к односпиральной ДНК	85	9

Показания:

детекция антител к инсулину при диабете I типа
появление антител к инсулину при инсулиновой терапии

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным бычьим, свиным и рекомбинантным человеческим инсулином. Присутствующие в разведенной сыворотке антитела к этим антигенам связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. При промывке удаляются все не связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке.

Антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, иммунологически связываются со связавшимися в лунках антителами из сывороток пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуетс с образованием голубого крашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты, при этом раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствующих в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора 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 крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.

- Стоп-раствор содержит раствор фосфорной кислоты. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для разбавления образцов и промывочный буферный раствор) содержат азид натрия в качестве консервантов. Азид натрия (NaN_3) высоко токсичное и активное в чистом виде вещество. В той концентрации, в которой он находится в компонентах набора, он не опасен. Несмотря на это производители набора настоятельно рекомендуют с осторожностью использовать набор (пп 7,8,9)
- Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При смыве в канализацию рекомендуется разбавлять отходы большим количеством воды для снижения активного уровня.
- Во время работы пользуйтесь одноразовыми перчатками и тщательно мойте руки после работы.
- Не отбирайте образцы ртом
- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить и пользоваться косметикой.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях для использования контролей и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови следуйте локальным юридическим руководствам.

МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых смесью высокоочищенного бычьего, свиного и рекомбинантного человеческого инсулинов. Готов к использованию.	1
Калибраторы анти-инсулина (A-F) в сывороточно/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), содержащие: 6 флаконов 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли анти-инсулина в сывороточно/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris , $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, PROCLIN 300 $< 0,5\%(\text{v/v})$) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (фосфатно-солевой буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

Хранить при 2 - 8 °С

Ячейки микропланшета хранятся в пакете с осушителем

Компоненты набора стабильны до срока годности, указанного на этикетках.

Беречь реагенты от воздействия тепла, солнца и яркого света при хранении и использовании.

Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °С

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер
- Лабораторный таймер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л
- Вортекс
- программное обеспечение для ридера

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ по выполнению анализа

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°С).
- Подготовьте все реагенты и образцы перед началом работы. Начав работать, выполняйте все шаги анализа без задержек для получения надежных и воспроизводимых результатов.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеразбавленные образцы.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Избегайте контаминации переносом образца в соседние ячейки – используйте одноразовые наконечники для каждого образца и реагента.
- Качественная промывка принципиальна для результата анализа, удаляйте оставшиеся капли полностью после промывки.

- Точно соблюдайте длительность инкубаций
- Контрольные образцы или пулированные сыворотки анализируйте как неизвестные для проверки работы реагентов и выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.
- Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Используйте эти значения для построения калибровочной кривой, если хотите рассчитать результаты полуколичественно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.
- Приготовление буферного промывочного раствора
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.
- Приготовление образцов
- Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.
2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от A до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (18-28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Insulin ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

интерпретация РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест считается валидным при условии, что измеренные величины оптической плотности при 450 нм отрицательного, положительного контролей и калибраторов (A-F) согласуются с диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, вложенном в набор. Если критерии не выполняются, результаты анализа считаются недостоверными, и анализ необходимо повторить.

Расчет результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации и log-log координаты.

Для ручного расчета рекомендуется линейно-логарифмическая миллиметровая бумага. Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровую бумагу и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При При изучении нормального диапазона образцов сывороток здоровых доноров при использовании данного набора были установлены следующие значения:

	Анти-инсулин (Е/мл)
норма	< 10
повышенные	> 10

Положительные результаты должны быть выверены относительно полной картины клинического статуса пациента. Также каждое терапевтическое решение должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии. Приведенные значения можно использовать только как ориентировочные.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы.

Обр а-зец	Разба в-ление	Наблю - даемая конц. (Е/мл)	Ожидаемая (Е/мл)	Наб л./О жид.
1	1:50	77.6	38.8	107 %
	1:100	41.7		
	1:200	21.1	19.4	109 %
	1:400	10.3	9.7	106 %
	1:800	4.7	4.9	96%
2	1:100	100.7	50.4	101 %
	1:200	50.7		
	1:400	23.7	25.2	94%
	1:800	11.1	12.6	88%
	1:1600	5.3	6.3	84%

Воспроизводимость

Калибраторы

No	Поз и-ция	ОП 1	ОП 2	Знач ение	Кон ц 1	Кон ц 2	Знач ение	ож. Кон ц	CV %
STA	A 1/B 1	0,03 6	0,03 2	0,03 4	0,1	0,1	0,1	0,0	8
STB	C 1/D 1	0,35 4	0,34 5	0,34 9	6,3	6,1	6,2	6,3	2
STC	E 1/F 1	0,62 1	0,60 2	0,61 1	12,9	12,4	12,7	12,5	2
STD	G1/ H 1	0,98 4	1,00 5	0,99 4	25	25	25	25	1
STE	A 2/B 2	1,50 3	1,50 0	1,50 2	50	50	50	50	0
STF	C 2/D 2	2,05 7	2,03 5	2,04 6	102	99	100	100	1

Статистика была рассчитана для каждого из трех образцов в 24 определениях в одиночном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных анализов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			между сериями		
Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]	Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	11,2	2,5	1	11,6	6,0
2	27,6	2,9	2	31,2	5,2
3	59,7	4,0	3	69,5	4,3

Чувствительность

Нижняя граница определения для данного набора– 0,5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет сорбирован смесью высоко очищенных бычьего, свиного и рекомбинантного человеческого инсулинов. Таким образом, данный набор распознает только специфичные IgG-антитела к этим инсулинам. Перекрестных реакций не обнаружено.

Калибровка

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к инсулину, тест-система прокалибрована в относительных единицах.

Ограничения метода

Набор следует использовать как дополнительный диагностический метод, но он не должен использоваться как основной и единственный. Диагностика не может основываться на результате единственного теста, такой результат должен оцениваться клиницистами только в совокупности с информацией, полученной от других клинических и лабораторных исследований.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз до 1000 мг/дл
Липемия до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин до 40 мг/дл
Антикоагулянты в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы, ЗАО "БиоХимМак"
тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214, факс (095) 939-09-97
E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Добавить
100 μ л стандартов в
микроячейки

Контроли
100 μ л контролей или проб
пациента

☐ ☐
Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

☐
Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора
☐

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

☐
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

☐
Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора
☐

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

☐
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

☐
Выдержать 5 минут и Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись *Долгов В.В.*
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись *_____*
« ____ » ____ 20 ____ года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител классов IgG/IgM к β 2-гликопротеину I (Anti- β 2-Glycoprotein I IgG/IgM).

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения антител классов IgG/IgM к β 2-протеину I (β 2GPI) методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях выявления повышенного риска развития тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (SLE) или с подобными заболеваниями.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Выявление антител к β 2-гликопротеину I ассоциировано с такими связанными с тромбофилией синдромами заболеваний, как тромбоз, тромбоцитопения или невынашивание беременности с системной красной волчанкой. β 2-гликопротеин I (аполипопротеин H) – это β 2-глобулин с молекулярной массой 50 кДа, присутствующий в плазме в концентрации около 200 мкг/мл. Было показано, что β 2-гликопротеин I (β 2GPI) ингибирует коагуляцию и, таким образом, он вовлечен в процесс свертывания крови. β 2GPI *in vivo* связан с каким-либо отрицательно заряженным ионом, например, фосфолипидами, гепарином или липопротеинами. Место связывания с липидами расположено в пятом домене. Не так давно обнаружили, что β 2-гликопротеин I является ко-фактором для аутоантител к кардиолипину. Многие исследования подтвердили его ключевую роль в характерном связывании антител к кардиолипину с иммобилизованным кардиолипином.

Детальные исследования, касающиеся природы комплекса кардиолипин/ β 2GPI показали, что эпитопы пятого домена β 2GPI являются мишенью для «анти-кардиолипидных антител» в отсутствие отрицательно заряженных фосфолипидов. β 2GPI является не только необходимым условием связывания анти-кардиолипидных антител; было показано, что он также является и первичным антигеном для своих собственных аутоантител. Образцы сывороток пациентов, страдающих антифосфолипидным синдромом, были протестированы как на антитела к кардиолипину, так и на антитела к β 2GPI. Выявленная хорошая корреляция между этими двумя типами антител подтверждает все вышесказанное. Наличие аутоантител к β 2-гликопротеину I описано при различных аутоиммунных заболеваниях. Присутствие анти- β 2GPI антител может быть соотнесено с развитием артериального и венозного тромбозов, венозной тромбоэмболии, тромбоцитопении или синдрома невынашивания. Существуют анти- β 2-гликопротеин I антитела классов IgG-, IgM- и IgA. Антитела класса IgM являются значимым индикатором при диагностике начальных стадий аутоиммунных заболеваний, тогда как антитела класса IgG выявляются на более поздних стадиях, при выраженных аутоиммунных заболеваниях. Титр анти- β 2GPI антител класса IgG хорошо коррелирует с клинической картиной наблюдаемого у пациента тромбоза, тромбоэмболии и повторных

выкидышей, тогда как анти- β 2GPI антитела класса IgM в значительной степени связаны с тромбозами и тромбоцитопенией. Показаниями к определению анти- β 2- гликопротеина I антител являются:

- СКВ
- артериальный и венозный тромбозы
- венозная тромбоэмболия
- тромбоцитопения
- невынашивание

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он предназначен для количественного определения антител классов IgG/IgM к β 2-гликопротеину I. Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I. Присутствующие в образцах антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG и IgM человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетс с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора, при этом Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG/IgM в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора 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.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'- тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
 8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
 9. Не отбирайте образцы ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I	1
Комбинированные стандарты с антителами к β 2-гликопротеину I классов IgG и IgM (A-F) в сывороточно/буферном (PBS/BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл и IgM: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к β 2-гликопротеину I классов IgG и IgM в сывороточно-буферном (PBS/BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи IgG антитела против IgG человека, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи IgG антитела против IgM человека, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат 50x	1 флакон 20 мл

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл

Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л

Лабораторный таймер

программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°С) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разбавьте все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.
2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
a	CA	CE	P2	P6		
b	CA	CE	P2	P6		
c	CB	K1	P3	P..		
d	CB	K1	P3	P..		
e	CC	K2	P4			
f	CC	K2	P4			
g	CD	P1	P5			
h	CD	P1	P5			

CA-CF: стандарты А - Е

P1, P2...: образцы 1, 2 ...

K1: положительный контроль

K2: отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC анти-β2-гликопротеин I IgG/IgM ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля

(1) Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации сплайнами.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерения в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

Пример расчета результатов

Данные, приведенные ниже, показывают типичные результаты, полученные с помощью данного метода ORGENTEC Rheumatoid Factor IgA ELISA. Эти данные предназначены только для иллюстрации и не должны быть использованы для расчета результатов какой-либо постановки.

стандарты									
No.	лунка	ОП 1	ОП 2	Среднее	конц. 1	конц. 2	Среднее	Заявленная конц.	CV %
ST A	A 1/B 1	0,124	0,122	0,123	0,001	0,001	0,001	0,001	1
ST B	C 1/D 1	0,281	0,282	0,281	5,4	5,4	5,4	6,3	0
ST C	E 1/F 1	0,579	0,578	0,579	12,9	12,9	12,9	12,5	0
ST D	G 1/H 1	0,990	0,995	0,993	25,2	25,4	25,3	25,0	1
ST E	A 2/B 2	1,463	1,488	1,476	50,5	48,6	49,5	50,0	1
ST F	C 2/D 2	1,862	1,865	1,863	100,4	99,7	100,1	100,0	0

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании нормального диапазона значений анти-β2-гликопротеин I антител в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

анти-β2-гликопротеин I – Ab: IgG [Ед/мл] IgM [Ед/мл] норма: < 5
 < 8 пограничная зона : 5 - 8 5 - 8 повышенные значения: > 8
 > 8

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к гистонам.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией анти-β2-гликопротеин I антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом.

anti-β2-GPI	Образец №	Разведение	Полученное [Ед/мл]	Ожидаемое [Ед/мл]	П/О
IgG	1	1:200	100.0		
		1:400	49.8	50.0	100 %
		1:800	25.5	25.0	102 %
		1:1600	13.1	12.5	105 %
		1:3200	6.9	6.3	110 %
		1:6400	3.5	3.1	113 %
IgG	2	1:100	80.9		
		1:200	42.0	40.5	104 %
		1:400	21.1	20.2	104 %
		1:800	10.7	10.1	106 %
		1:1600	5.6	5.1	110 %
		1:3200	2.8	2.5	112 %
IgM	3	1:100	97.6		
		1:200	49.0	48.8	100 %
		1:400	23.2	24.4	95 %
		1:800	13.4	12.2	110 %
		1:1600	6.4	6.1	105 %
		1:3200	3.0	3.1	97 %
IgM	4	1:200	70.3		
		1:400	33.5	35.2	95 %
		1:800	18.6	17.6	106 %
		1:1600	10.1	8.8	115 %
		1:3200	5.4	4.4	123 %

Воспроизводимость

Статистика для коэффициентов вариации (CV) была рассчитана для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии, воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	14.7	3.8
2	30.0	2.5
3	67.9	2.1

Внутри серии		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	13.4	5.0
2	24.3	2.1
3	88.0	2.8

Между сериями		
---------------	--	--

Образец No	Среднее х [Ед/мл]	CV [%]
1	11.0	7.4
2	29.5	7.9
3	94.9	2.6

Между сериями		
Образец No	Среднее х [Ед/мл]	CV [%]
1	15.7	6.3
2	32.6	4.1
3	82.9	4.3

Чувствительность

Нижняя граница определения для анти-β2-гликопротеин I антител составляет 0.5 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт особо чистым препаратом β2-гликопротеина I. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к β2-гликопротеину I.

Эндогенный β2-гликопротеин I и эндогенные отрицательно заряженные фосфолипиды присутствуют в разведенной (1:100) сыворотке в концентрациях приблизительно 2 мкг/мл и приблизительно 1 мкг/мл, соответственно. Влияния на определение анти-β2-гликопротеин I антител не выявлено.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к β2-гликопротеину I, тест-система прокалибрована в относительных единицах. Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Louisville, США, и IgG специфичному референсному материалу IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Анти β2-гликопротеин I IgG/IgM ELISA может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к гистонам

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Удалите содержимое ячеек и трижды
промойте 300 мкл
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

9 **листов**

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

«_____» _____ 2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител класса IgA к β 2-гликопротеину I Anti- β 2-Glycoprotein I IgA.

рукция пользователя

НАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения антител класса IgA к β 2-glycoprotein I методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и моче человека. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только для выявления повышенного риска развития тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) или с волчанкоподобными заболеваниями.

НИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Выявление антител к β 2-гликопротеину I ассоциировано с такими связанными с фосфолипидным синдромом заболеваниями, как тромбоз, тромбоцитопения или невынашивание беременности с системной красной волчанкой. β 2-гликопротеин I (аполипопротеин H) – это β 2-глобулин с молекулярной массой 50 кДа, присутствующий в плазме в концентрации около 200 мкг/мл. Было показано, что β 2-гликопротеин I (β 2GPI) ингибирует коагуляцию и, таким образом, он вовлечен в процесс свертывания крови. β 2GPI *in vivo* связан с каким-либо отрицательно заряженным веществом, например, фосфолипидами, гепарином или липопротеинами. Место связывания с фосфолипидами расположено в пятом домене. Не так давно обнаружили, что β 2-гликопротеин I является ко-фактором для аутоантител к кардиолипину. Многие исследования подтвердили его незаменимую роль в характерном связывании антител к кардиолипину с иммобилизованным кардиолипином. Детальные исследования, касающиеся природы комплекса кардиолипина/ β 2GPI показали, что эпитопы пятого домена β 2GPI являются мишенью для «анти-кардиолипидных антител» в отсутствие отрицательно заряженных фосфолипидов. β 2GPI является не только необходимым условием связывания анти-кардиолипидных антител; было показано, что он также является и первичным антигеном для своих собственных аутоантител. Образцы сывороток пациентов, страдающих антифосфолипидным синдромом, были протестированы как на антитела к кардиолипину, так и на антитела к β 2GPI. Выявленная хорошая корреляция между этими двумя типами антител подтверждает все вышесказанное. Наличие аутоантител к β 2- гликопротеину I описано при различных аутоиммунных заболеваниях. Присутствие анти- β 2GPI антител может быть соотнесено с развитием артериального и венозного тромбозов, венозной тромбоэмболии, тромбоцитопении или синдрома невынашивания. Существуют анти- β 2-гликопротеин I антитела классов IgG-, IgM- и IgA. Антитела класса IgM являются значимым индикатором при диагностике начальных стадий аутоиммунных заболеваний, тогда как антитела класса IgG выявляются на более поздних стадиях, при выраженных аутоиммунных заболеваниях. Титр анти- β 2GPI антител класса IgG хорошо коррелирует с клинической картиной наблюдаемого у пациента тромбоза, тромбоэмболии и повторных выкидышей, тогда как анти- β 2GPI антитела класса IgM в значительной степени связаны с тромбозами и тромбоцитопенией. Показаниями к определению анти- β 2- гликопротеина I антител являются:

- СКВ
- артериальный и венозный тромбозы
- венозная тромбоэмболия
- тромбоцитопения
- невынашивание

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он предназначен для количественного определения антител классов IgA к β 2-гликопротеину I. Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I. Присутствующие в образцах антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgA человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора, при этом Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgA в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора 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.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
 8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
 9. Не отбирайте образцы ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I	1
Комбинированные стандарты с антителами к β 2-гликопротеину I класса IgA (A-F) в сывороточно/буферном (PBS/BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие IgA: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к β 2-гликопротеину I в сывороточно-буферном (PBS/BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат 50x	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл

Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л

Лабораторный таймер

программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.

3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ. 4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C. 5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности. 6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление буферного промывочного раствора
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление образцов
- Разбавьте все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.
- Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.

2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.
 3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC анти-β2-гликопротеин I IgA ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1) Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации сплайнами.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерения в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании нормального диапазона значений анти-β2-гликопротеин I антител в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

анти-β2-гликопротеин I –Ab:	IgA [Ед/мл]	
норма:	< 5	пограничная зона : 5 - 8
повышенные значения:	> 8	

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к гистонам.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией IgA анти-β2-гликопротеин I антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом.

anti-β2-GPI	Образец №	Разведение	Полученное [Ед/мл]	Ожидаемое [Ед/мл]	П/О
IgA	1	1:200	69.6		
		1:400	34.7	34.8	100 %
		1:800	15.7	17.4	90 %
		1:1600	8.7	8.7	100 %
IgA	2	1:100	95.2		
		1:200	44.3	47.6	93 %
		1:400	23.1	23.8	97 %
		1:800	11.4	11.9	96 %
		1:1600	5.0	5.9	85 %

Воспроизводимость

Статистика для коэффициентов вариации (CV) была рассчитана для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии, воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	72.9	3.9
2	48.2	5.3
3	9.6	3.5

Между сериями		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	71.0	3.4
2	48.1	1.7
3	9.4	2.8

Чувствительность

Нижняя граница определения для анти-β2-гликопротеин I антител составляет 0.5 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт особо чистым препаратом β2-гликопротеина I. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к β2-гликопротеину I.

Эндогенный β2-гликопротеин I и эндогенные отрицательно заряженные фосфолипиды присутствуют в разведенной (1:100) сыворотке в концентрациях приблизительно 2 мкг/мл и приблизительно 1 мкг/мл, соответственно. Влияния на определение анти-β2-гликопротеин I антител не выявлено.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к β2-гликопротеину I, тест-система прокалибрована в относительных единицах. Калибровка была проведена относительно признанной международным стандартом сыворотке E.N. Harris, Louisville. Эта сыворотка положительна по антителам к β2-гликопротеину I.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

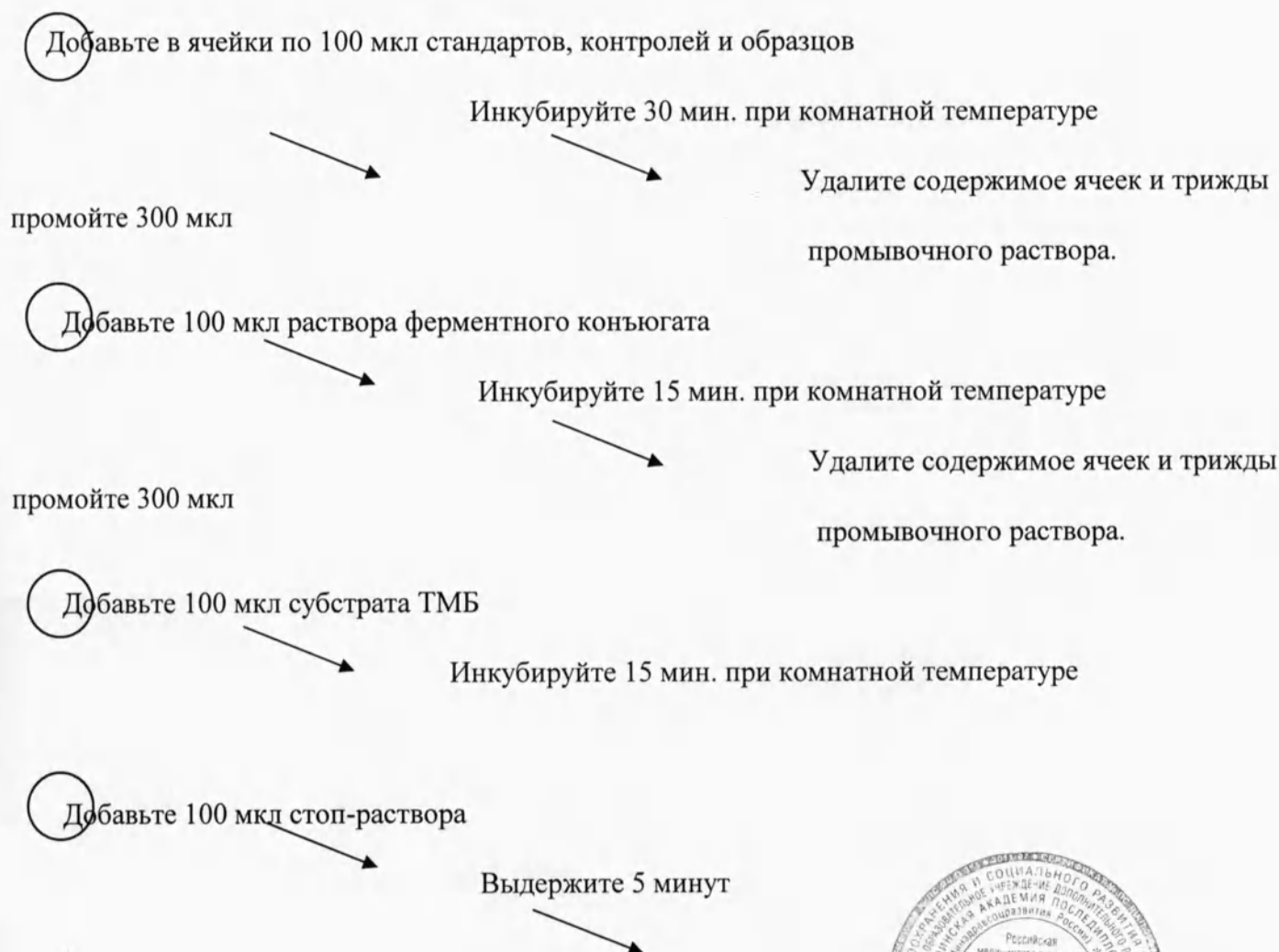
Анти β 2-гликопротеин I IgA ELISA может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к гистонам



Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



Подпись *Долгов В.В.*
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись *_____*
" " 20__ года

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«__» ____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
антител классов IgG, IgM и IgA к β 2-гликопротеину I (Anti- β 2-Glycoprotein I Screen).*

инструкция пользователя

ЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения антител классов IgG, IgM и к β 2-гликопротеину I (β 2GPI) методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях выявления повышенного риска развития тромбоза у пациентов с темной красной волчанкой (SLE) или с подобными заболеваниями.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Выявление антител к β 2-гликопротеину I ассоциировано с такими связанными с фосфолипидным синдромом заболеваниями, как тромбоз, тромбоцитопения или невынашивание в и с системной красной волчанкой. β 2-гликопротеин I (аполипопротеин H) – это β 2-глобулин с молекулярной массой 50 кДа, присутствующий в плазме в концентрации около 200 мкг/мл. Было известно, что β 2-гликопротеин I (β 2GPI) ингибирует коагуляцию и, таким образом, он вовлечен в процесс свертывания крови. β 2GPI *in vivo* связан с каким-либо отрицательно заряженным компонентом, например, фосфолипидами, гепарином или липопротеинами. Место связывания с фосфолипидами расположено в пятом домене. Не так давно обнаружили, что β 2-гликопротеин I является ко-фактором для аутоантител к кардиолипину. Многие исследования подтвердили его незаменимую роль в характерном связывании антител к кардиолипину с иммобилизованным кардиолипином. Детальные исследования, касающиеся природы комплекса кардиолипин/ β 2GPI показали, что эпитопы пятого домена β 2GPI являются мишенью для «анти-кардиолипиновых антител» в отсутствие отрицательно заряженных фосфолипидов. β 2GPI является не только необходимым условием связывания анти-кардиолипиновых антител; было показано, что он также является и первичным антигеном для своих собственных аутоантител. Образцы сывороток пациентов, страдающих антифосфолипидным синдромом, были протестированы как на антитела к кардиолипину, так и на антитела к β 2GPI. Выявленная хорошая корреляция между этими двумя типами антител подтверждает все вышесказанное. Наличие аутоантител к β 2- гликопротеину I описано при различных аутоиммунных заболеваниях. Присутствие анти- β 2GPI антител может быть соотнесено с развитием артериального и венозного тромбозов, венозной тромбоземболии, тромбоцитопении или синдрома невынашивания.

Существуют анти- β 2-гликопротеин I антитела классов IgG-, IgM- и IgA. Антитела класса IgM являются значимым индикатором при диагностике начальных стадий аутоиммунных заболеваний, тогда как антитела класса IgG выявляются на более поздних стадиях, при выраженных аутоиммунных заболеваниях. Титр анти- β 2GPI антител класса IgG хорошо коррелирует с клинической картиной наблюдаемого у пациента тромбоза, тромбоземболии и повторных выкидышей, тогда как анти- β 2GPI антитела класса IgM в значительной степени связаны с тромбозами и тромбоцитопенией. Показаниями к определению анти- β 2- гликопротеина I антител являются:

- артериальный и венозный тромбозы
- венозная тромбоэмболия
- тромбоцитопения
- невынашивание

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он предназначен для количественного определения антител классов IgG, IgM и IgA к β 2-гликопротеину I. Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I. Присутствующие в образцах антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG, IgM и IgA человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетс с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора, при этом Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG, IgM и IgA в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора 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.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
 8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
 9. Не отбирайте образцы ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

набор	96 тестов
микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I	1
контроли антител к β 2-гликопротеину I классов IgG, IgM и IgA в проточно-буферном (PBS/BSA, NaN3 <0,1% (w/w)) матриксе: негативный контроль (A) – 3.3 ед/мл Off-контроль (B) – 10 ед/мл негативный контроль (C) – 30 ед/мл полностью позитивный контроль (D) – 90 ед/мл Готовы к использованию	4 флакона 1,5 мл каждый
буфер для образцов (Tris, NaN3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)) ферментного конъюгата (светло-розовый), содержащий смесь поликлональных кроличьих античеловеческих анти-IgG-IgG, анти-IgM-IgG, анти-IgA-IgG антител, меченых пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат 50x	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл

Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л

Лабораторный таймер

программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.

Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.

Не меняйте компоненты наборов из различных лотов

Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.

Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции

Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов

Наносите все образцы на дно лунок

Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей

Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.

Необходимо соблюдать время всех инкубаций

Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.

Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разбавьте все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.

Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно обработанных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	CA	C E	P 1	P. .								
b	CA	C E	P 1	P. .								
c	CB	C F	P 2									
d	CB	C F	P 2									
e	CC	K 1	P 3									
f	CC	K 1	P 3									
g	CD	K 2	P 4									
h	CD	K 2	P 4									

- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28 °C).
 - Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 - Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 - Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 - Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 - Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 - Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 - Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
 - Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC анти-β2-гликопротеин I Screen ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Негативного контроля (A), Cut-Off контроля (B), Позитивный контроля (C) и Сильно позитивного контроля (D) полностью совпадают с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется непосредственное сравнение оптической плотности образца каждого пациента с оптической плотностью контролей. Образцы с оптической плотностью выше, чем оптическая плотность контроля cut-off, считаются положительными.

Отрицательный: ОП пациента < ОП cut-off контроля

Положительный: ОП пациента > ОП cut-off контроля

Сильноположительный: ОП пациента ≥ ОП сильноположительного контроля

полуколичественного расчета результатов теста могут быть использованы концентрации и результаты измерения ОП контролей, которые используются для построения калибровочной кривой (рекомендуемая кривая - 4-параметрическая в полулогарифмических координатах). Концентрации известных образцов рассчитываются по калибровочной кривой.

Offset: 10ед/мл

В положительном результате в скрининговом тесте дальнейшее типирование аутоантител к β 2GPI можно проводить с использованием наборов для количественного определения антител классов IgG, IgM и IgA.

Каждый набор определяет сумму аутоантител всех трех классов (IgG, IgM и IgA). Образцы пациентов, содержащие 2 или 3 класса аутоантител к β 2GPI в низких концентрациях могут быть положительными в скрининговом тесте благодаря суммирующему эффекту. Такие образцы могут оказаться отрицательными при исследовании на отдельные классы аутоантител (IgG, IgM и IgA).

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт особо чистым препаратом β 2-гликопротеина I. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к β 2-гликопротеину I.

Эндогенный β 2-гликопротеин I и эндогенные отрицательно заряженные фосфолипиды присутствуют в разведенной (1:100) сыворотке в концентрациях приблизительно 2 мкг/мл и приблизительно 1 мкг/мл, соответственно. Влияния на определение анти- β 2-гликопротеин I антител не выявлено.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к β 2-гликопротеину I, тест-система прокалибрована в относительных единицах. Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Louisville, США, и IgG специфичному референсному материалу IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Анти β 2-гликопротеин I Screen ELISA может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промойте промывочного раствора.

добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

мойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

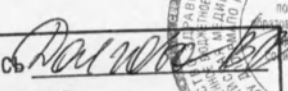
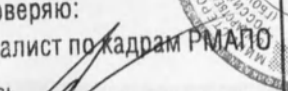
Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись 	
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись 	
" " 20__ года	

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«__» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к ВРІ иммуноферментным методом.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-BPI основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) количественного определения антител класса IgG к BPI (белок, повышающий проницаемость) в человеческой сыворотке или плазме. Набор предназначен только для диагностики in vitro.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Акроним ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела, аутоантитела к цитоплазматическим антигенам нейтрофилов) объединяет аутоантитела, специфичные к различным цитоплазматическим антигенам гранулоцитов, моноцитов и, возможно, эндотелиальных клеток.

PR3 и MPO хорошо известны как надежные серологические маркеры для конкретной группы первичных системных васкулитов (PCB, PSV), которые также называют ANCA-ассоциированными васкулитами (AAV). Распространенность AAV очевидно выше, чем предполагается. Встречаемость составляет 1.5 на 1000 и в группе пожилых людей около 5 на 1000. Клиническое проявление AAV характеризуется манифестациями в легких, почках и дыхательном тракте. За последние годы новыми исследованиями были открыты и охарактеризованы многие новые рANCA антигены: эластаза, катепсин G, лизоцим и лактоферрин.

До настоящего времени скрининг ANCA проводился иммунофлуоресцентным методом, что вызывает трудности в оценке и клинической интерпретации результатов. Кроме того, результаты должны быть тщательно оценены с детектированием на других клетках или на других системах, например ИФА (ELISA). Кроме того, невозможно дифференцировать единичный сANCA и рANCA антигены.

Протеиназа 3

Основной антиген сANCA реактивности – это нейтральная сериновая протеаза 3 (синонимы: p29, AGP7, аутоантиген Вегенера), которая принадлежит семейству трипсина/химотрипсина. В 1988 году многочисленные группы показали что этот антиген является белком с молекулярной массой 29 кДа. PR3 был уже описан в 1973 году исследователями Ohlsson и Olsson, под названием нейтрофильная коллагеназа. Между тем, кажется, что аутоантитела к PR3 высокоспецифичны как серологический маркер для диагностики гранулематоза Вегенера (специфичность: на ранней стадии 50%, при генерализованном процессе > 90%). Кроме того, существует корреляция между концентрацией аутоантител и активностью заболевания.

Миелопероксидаза.

Миелопероксидаза является основным антигеном в приблизительно 60% случаев обнаружения рANCA. Присутствие аутоантител к MPO классифицируется как характерный маркер быстро прогрессирующего нефрита. Эти антитела встречаются у 70-90% всех пациентов с серьезными повреждениями почек. Кроме того, они были выявлены при синдроме Чарг-Штрауса (CSS), микроскопическом полиангиите (МПА) и других васкулитах. Концентрация аутоантител

хорошо коррелирует с активностью заболевания при МРА. МРА также характеризуется манифестациями в легких, почках и дыхательном тракте, но эти проявления, в отличие от WG, не гранулематозные. Эти антитела, в отличие от высокоспецифичных антител к PR3 при WG, обладают более низкой специфичностью, 60%, при диагностике МРА. Отсутствие аутоантител к МРО и PR3, при одновременном выявлении ANA, может быть использовано в качестве инструмента для дифференциальной диагностики между AAV и SLE индуцированными васкулитами.

ВРІ (белок, повышающий проницаемость).

Белок, повышающий проницаемость, ВРІ, это мембранный белок, классифицируемый как ANCA-антиген полиморфно-ядерных гранулоцитов и моноцитов, которые связывают эндотоксин. Аутоантитела к нему в настоящий момент классифицируются как сANCA. Из-за высокой аффинности ВРІ к липополисахаридам он обладает значительным антимикробным эффектом по отношению к грамотрицательным бактериям. ВРІ расщепляется и таким образом инактивируется под воздействием эластазы или другой сериновой протеазы. Аутоантитела к ВРІ практически всегда выявляются при хронических заболеваниях кишечника, болезни Крона или язвенных колитах. В отличие от анти-МРО и анти-PR3 аутоантител, аутоантитела к ВРІ никак не связаны с васкулитами.

Эластаза

Эластаза – это сериновая протеаза, ее первичная последовательность на 54% гомологична протеиназе 3. Она встречается в основном в полиморфно-ядерных нейтрофильных гранулоцитах (PMN), в макрофагах и эндотелиальных клетках. Расщепление протеогликанов нейтрофилами происходит в основном благодаря протеолитической активности эластазы. Более того, эластаза активно участвует в деструкции ткани, связанной с эмфиземой и ревматоидным артритом. Аутоантитела к этому антигену обычно ассоциированы с воспалительными ревматоидными заболеваниями, ревматоидным артритом и васкулитом.

Катепсин G

Катепсины принадлежат к группе внутриклеточных протеаз, в основном обнаруживаемых в лизосомах, в особенности в селезенке, печени и почках. Катепсин G это сериновая протеаза и дополнительный рANCA антиген. Он участвует в большей части в деструкции костной ткани из-за своих гидролитических свойств. Аутоантитела к катепсину G встречаются в основном при коллагенозах и других сходных воспалительных заболеваниях, ревматизме, СКВ, синдроме Шегрена и синдроме Фелти.

Лизоцим.

Лизоцим – это гликозидаза, которая расщепляет гликозидную связь между C-1 MNAc и C-4 GlcNAc. Лизоцим локализуется в азурофильных, а также специфических гранулах нейтрофилов и во внеклеточных жидкостях, таких как слезы и слюна, где он проявляет свою антимикробную активность по отношению к проникающим бактериям. LZ также относится к рANCA и аутоантитела к лизоциму встречаются с высокой частотой при ревматоидном васкулите и воспалительных заболеваниях пищеварительного тракта, например, при язвенных колитах.

Лактоферрин

Лактоферрин (LF) это железосвязывающий гликопротеин, который присутствует в высоких концентрациях в секретах слизистых оболочек, в слезной жидкости и молоке. LF также хранится в специфических гранулах полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов (PMN) и секретируется (экзоцитоз) при активации PMN. Во время активного воспалительного заболевания может быть измерен повышенный уровень LF в сыворотке. Физиологический антимикробный эффект лактоферрина зависит от его железосвязывающей способности, так как большинству бактерий необходимо железо для их собственного метаболизма. LF ингибирует миелопероксидазу, препятствует активации комплемента и образованию гидроксильных радикалов. Вполне возможно, что LF играет много важных ролей, таких как секреторный IgA, как неспецифический противовоспалительный защитный фактор поверхности слизистых оболочек. LF относится к рANCA, в зависимости от перераспределения из гранул к ядрам в ходе фиксации этанолом.

аутоантитела к лактоферрину встречаются с высокой частотой у пациентов с ревматоидными васкулитами (RV), язвенными колитами (CU) и первичным склерозирующим холангитом (PSC).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом BPI. Присутствующие в образцах антитела к BPI связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислого стоп-раствора, при этом окрашивание меняется на желтое. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации аутоантител IgG к BPI в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора 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.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Стоп-раствор содержит фосфорную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
 8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
 9. Не отбирайте образцы ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Соблюдайте рекомендации по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях, тестируйте контроли и/или пулированные сыворотки. При работе со всеми компонентами набора соблюдайте существующие локальные правила работы лаборатории..

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Компонент набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых особо чистым препаратом BPI	1
Комбинированные стандарты с IgG антителами к BPI (A-F) в сывороточно/буферном (PBS/BSA, NaN3 <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; и 100 Ед/мл Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к BPI в сывороточно-буферном (PBS/BSA, NaN3 <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% фосфорная кислота). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буфер для промывок, концентрат 50x, Готов к использованию	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
 - Вортекс
 - Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
Лабораторный таймер
программное обеспечение для анализа результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

БОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.

Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.

Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.

Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.

Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°С) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разведите содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Добавьте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.

2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от A до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28°C) 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку.

5. Добавьте по 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.

6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку.

8. Добавьте по 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.

9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.

11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время. Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-BPI ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1) Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией анти-BPI IgG антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом. Показана линейность метода на всем диапазоне измеряемых значений.

Чувствительность

Нижняя граница определения для данного метода определения анти-BPI IgG антител составляет 0.5 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт особо чистым препаратом BPI. Препарат BPI очищен с помощью аффинной хроматографии. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к BPI. Не наблюдалось перекрестной реактивности ни с каким другим ANCA антигеном.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к BPI, тест-система прокалибрована в относительных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный метод ORGENTEC Anti-BPI ELISA может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

119992, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (095) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к BPI

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

трижды промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Удалите содержимое ячеек и
промывочного раствора.

трижды промойте 300 мкл

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись Рачков В.В.
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ " ____ 20 ____ года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к эластазе Anti-Elastase

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор Anti-Elastase предназначен для количественного определения антител класса IgG к эластазе методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики in vitro.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Акроним ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела) определяет гуморальные аутоантитела, специфические к различным гранулоцитарным, моноцитарным и, возможно, эндотелиальным цитоплазматическим антигенам.

PR3 и MPO хорошо известны как надежные серологические маркеры для определенной группы первичных системных васкулитов (PSV), также известных как ANCA-ассоциированные васкулиты (AAV). Заболеваемость AAV очевидно выше, чем предполагается. Встречаемость составляет 1.5 на 1000, а в группе пожилых людей - около 5 случаев на 1000. Клиническое проявление AAV характеризуется обнаружениями в легких, почках и дыхательном тракте. В последние годы новые исследования выявили и охарактеризовали некоторые новые pANCA антигены: эластазу, катепсин G, лизоцим и лактоферрин.

Да настоящего времени скрининг ANCA проводили с помощью иммунофлуоресцентных методов, но при этом часто сталкивались со сложностями при оценке результатов и клинических данных. Поэтому результаты должны быть тщательно изучены с использованием количественных исследований, на других клетках или другими методами, подобными ELISA. Более того, не представляется возможным дифференцировать отдельные cANCA и pANCA антигены.

Протеиназа 3

Основным антигеном, определяющим реактивность cANCA является нейтральная сериновая протеаза 3, (синонимы: p29, AGP7, аутоантиген Вегенера), принадлежащая семейству трипсинов/химотрипсинов. В 1988 несколько групп исследователей показали, что антигеном является протеин с молекулярной массой 29 кДа. PR3 уже была описана в 1973 году исследователями Ohlsson и Olsson под названием коллагеназа нейтрофилов. Между тем считается доказанным, что аутоантитела к PR3 являются высокоспецифичным серологическим маркером при диагностике гранулематоза Вегенера (специфичность: начальная стадия 50%, генерализация > 90%). Более того, существует корреляция между концентрацией аутоантител и активностью заболевания.

Миелопероксидаза

Миелопероксидаза является основным антигеном примерно в 60% случаев выявления pANCA. Присутствие аутоантител к MPO классифицируется как надежный маркер быстро

агрессирующего нефрита. Более того, эти аутоантитела присутствуют у 70-90% всех пациентов, страдающих серьезными нарушениями функций почек. В добавок они выявляются при синдроме Риджа-Строса (CSS), микроангиопатии (МРА) и васкулитах. Концентрация антител хорошо коррелирует с активностью МРА. МРА также характеризуется клиническими проявлениями в легких, почках и дыхательном тракте, но эти проявления, в отличие от WG, не грануломатозные.

Однако, эти антитела, в отличие от высокоспецифичных к WG антител к PR3, имеют более низкую специфичность, 60%, при диагностике МРА. Отсутствие аутоантител к МРО и PR3, при одновременном выявлении антител к ANA, может быть использовано как инструмент для дифференциальной диагностики между AAV и SLE индуцированными васкулитами.

ВРІ

Бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость мембран, ВРІ, это мембраносвязанный белок, классифицируемый как ANCA-антиген полиморфно-ядерных гранулоцитов и моноцитов, связывающий эндотоксин. Эти аутоантитела в настоящее время классифицируются как cANCA. Так как ВРІ обладает высокой аффинностью к липополисахаридам, он обладает значительным антимикробным эффектом по отношению к грам-отрицательным бактериям. ВРІ расщипляется, и таким образом инактивируется, эластазой или другими сериновыми протеазами. Аутоантитела к ВРІ чаще всего выявляются при хронических инфекционных кишечных заболеваниях, болезни Крона или при язвенном колите. В отличие от анти-МРО и анти-PR3 аутоантител, антитела к ВРІ, похоже никаким образом не ассоциированы с васкулитами.

Эластаза

Эластаза – это сериновая протеаза, ее последовательность на 54% гомологична протеиназе 3. Она встречается в основном в полиморфно-ядерных нейтрофильных гранулоцитах (PMN), в макрофагах и эндотелиальных клетках. Удаление протеогликанов нейтрофилами происходит в основном благодаря протеолитической активности эластазы. Более того, эластаза несомненно принимает участие в деструкции ткани, связанной с эмфиземой и ревматоидным артритом.

Аутоантитела к этому антигену обычно ассоциированы с воспалительными ревматоидными заболеваниями, например, ревматоидным артритом и васкулитом.

Катепсин G

Катепсины принадлежат группе внутриклеточных протеаз, в основном обнаруживаемых в лизосомах, особенно селезенки, печени и почек. Катепсин G – это сериновая протеаза и кроме того - pANCA антиген. Он участвует в большой мере в деструкции костной ткани из-за своих гидролитических свойств. Аутоантитела к катепсину G присутствуют в основном при коллагенозах и других родственных воспалительных ревматических заболеваниях, например SLE, синдроме Шегрена и синдроме Фелти.

Лизоцим

Лизоцим – это гликозидаза, которая разрушает гликозидные связи между C-1 MNAc и C-4 GlcNAc. Лизоцим присутствует в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов и в компартментах внеклеточных жидкостей, таких как слезы или слюна, где он проявляет свою антимикробную активность против проникающих бактерий. LZ также относится к pANCA и аутоантитела к лизоциму с высокой частотой выявляются при ревматоидных васкулитах и воспалительных заболеваниях внутренних органов, таких как язвенных колит.

Лактоферрин

Лактоферрин (LF) – это железосвязывающий белок, который встречается в высоких концентрациях в секретах на слизистых оболочках, в слезах и в молоке. LF также находится в специфических гранулах полиморфно-ядерных нейтрофилов (ПМН, PMN), при активации PMN происходит их экзоцитоз. Во время активного воспалительного процесса можно измерить повышенный уровень LF в сыворотке. Физиологический антимикробный эффект лактоферрина зависит от его способности связывать железо, так как большинству бактерий необходимо железо для их собственных физиологических путей. LF ингибирует миелопероксидазу, предотвращает активацию комплемента и предупреждает образование гидроксильных радикалов. Вполне возможно, что LF

играет много важных ролей, так же как секреторный IgA, является неспецифическим противовоспалительным защитным фактором слизистых поверхностей. LF относится к pANCA, завися от depending on the перераспределение от гранул по направлению к ядру при фиксации этанолом. from the granules toward the nuclei, upon ethanol fixation. Аутоантитела к лактоферрину встречаются с высокой частотой у пациентов при ревматоидном васкулите (RV), язвенном колите (UC) и первичном склерозирующем холангите (PSC).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, в лунках которого сорбирован высокочистый эластаза. Если антитела к этому антигену присутствуют в разведенных образцах сыворотки или плазмы, то они связываются с иммобилизованным в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки или плазмы. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуются комплексы конъюгат/антитело/антиген. Избыток конъюгата удаляется при следующей промывке.

Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора, при этом цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики in vitro.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg 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.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокочистой эластазой. Готов к использованию	1
Комбинированные стандарты с IgG антителами к эластазе (A-F) в сывороточно/буферном (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие: IgG: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к эластазе в сывороточно-буферном (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Промывочный буфер (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат 50x	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

дистиллированная вода

мерные цилиндры на 100 и 1000 мл

пластиковый контейнер для хранения буфера для промывок

БОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все реагенты и образцы на дно лунок
8. Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного буфера

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед

использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

приготовление образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов в 100 раз буфером для образцов перед исследованием. Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных проб сывороток пациентов в дублях.
2. Добавьте в соответствующие ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов.

	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...C: образцы сыворотки или плазмы пациентов 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Elastase ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью

соответствуют с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

СЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах. Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

Пример расчетов

В таблице ниже приведены типичные результаты, полученные при анализе данным методом Anti-Elastase ELISA. Эти данные приведены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов какого-либо анализа.

Стандарты									
No	Позиция	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	декл. конц.	CV %
STAA	1 / B 1	0.036	0.037	0.037	0.1	0.1	0.1	0.0	3
STBC	1 / D 1	0.423	0.425	0.424	6.2	6.2	6.2	6.3	0
STCE	1 / F 1	0.716	0.744	0.730	12.5	13.2	12.9	12.5	3
STDG	1 / H 1	1.101	1.132	1.116	24	25	24	25	2
STEA	2 / B 2	1.660	1.637	1.649	51	50	51	50	1
STFC	2 / D 2	2.137	2.151	2.144	99	101	100	100	0

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к эластазе в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

Анти-эластаза IgG [Ед/мл]:

норма: < 10

повышенные значения: ≥ 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к эластазе. Приведенный референсный диапазон должен использоваться только как ориентировочный.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разведению сыворотки с высокой концентрацией антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом Anti-Elastase. Тестирование показало линейность метода во всем измеряемом диапазоне.

ВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

жняя граница определения для антител к эластазе составляет 0.5 Ед/мл.

СЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт высокочистой эластазой. Очистка антигена проводилась с помощью аффинной хроматографии. Данный тест специфичен только по отношению к аутоантителам к эластазе. Не наблюдалось какой-либо перекрестной реактивности с другими ANCA антигенами.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к эластазе, тест-система прокалибрована в условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Elastase ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,

ЗАО "БиоХимМак"

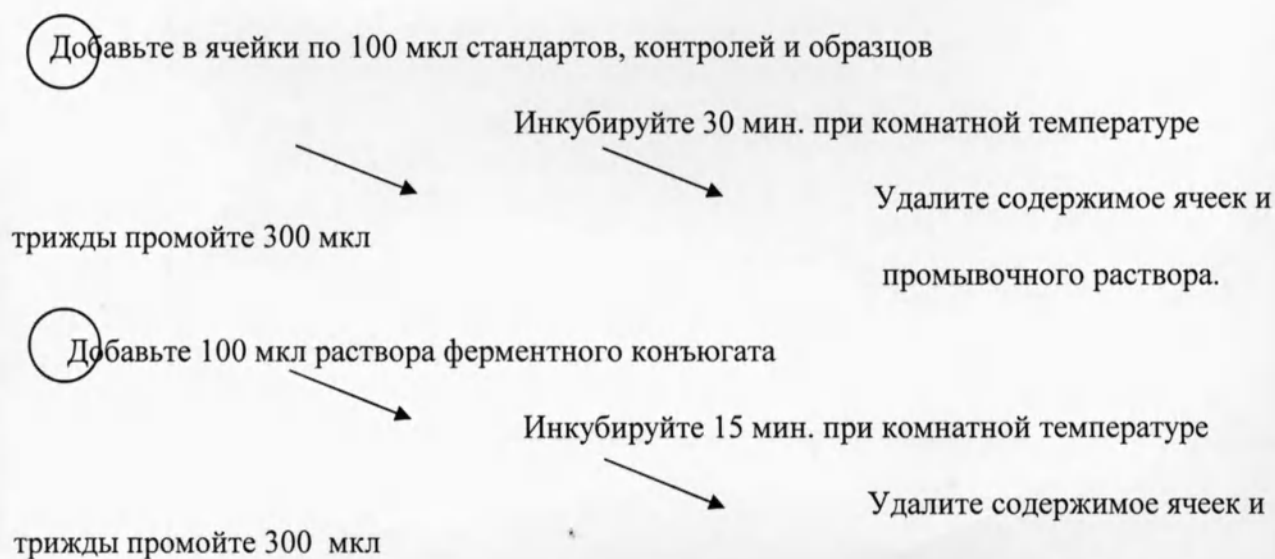
тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,

факс (095) 939-09-97

E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к лизоциму



промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора субстрата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к катепсину G иммуноферментным методом Anti-Cathepsin G

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Cathepsin G основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) количественного определения антител класса IgG к катепсину G в человеческой сыворотке или плазме. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Акроним ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела, аутоантитела к цитоплазматическим антигенам нейтрофилов) объединяет аутоантитела, специфичные к различным цитоплазматическим антигенам гранулоцитов, моноцитов и, возможно, эндотелиальных клеток.

PR3 и MPO хорошо известны как надежные серологические маркеры для конкретной группы первичных системных васкулитов (ПСВ, PSV), которые также называют ANCA-ассоциированные васкулиты (AAV). Распространенность AAV очевидно выше, чем предполагается. Встречаемость составляет 1.5 на 1000 и в группе пожилых людей около 5 на 1000.

Клиническое проявление AAV характеризуется манифестациями в легких, почках и желудочно-кишечном тракте. За последние годы новыми исследованиями были открыты и охарактеризованы многие новые pANCA антигены: эластаза, катепсин G, лизоцим и лактоферрин.

До настоящего времени скрининг ANCA проводился иммунофлуоресцентным методом, что часто вызывает трудности в оценке и клинической интерпретации результатов. Кроме того, результаты должны быть тщательно оценены с детектированием на других клетках или на других иммунных системах, например ИФА (ELISA). Кроме того, невозможно дифференцировать единичный cANCA и pANCA антигены.

Протеиназа 3

Основной антиген cANCA реактивности – это нейтральная сериновая протеаза 3 (синонимы: p29, AGP7, аутоантиген Вегенера), которая принадлежит семейству трипсина/химотрипсина. В 1988 году многочисленные группы показали что этот антиген является белком с молекулярной массой 29 кДа. PR3 был уже описан в 1973 году исследователями Ohlsson и Olsson, под названием нейтрофильная коллагеназа. Между тем, кажется, что аутоантитела к PR3 высокоспецифичны как серологический маркер для диагностики гранулематоза Вегенера (специфичность: на ранней стадии 50%, при генерализованном процессе > 90%). Кроме того, существует корреляция между концентрацией аутоантител и активностью заболевания.

Миелопероксидаза.

Миелопероксидаза является основным антигеном в приблизительно 60% случаев обнаружения pANCA. Присутствие аутоантител к MPO классифицируется как характерный маркер быстро прогрессирующего нефрита. Эти антитела встречаются у 70-90% всех пациентов с серьезными повреждениями почек. Кроме того, они были выявлены при синдроме Чарг-Штрауса (CSS), микроскопическом полиангиите (МПА) и других васкулитах. Концентрация аутоантител хорошо коррелирует с активностью заболевания при МПА. МПА также характеризуется

манифестациями в легких, почках и дыхательном тракте, но эти проявления, в отличие от WG, не гранулематозные. Эти антитела, в отличие от высокоспецифичных антител к PR3 при WG, обладают более низкой специфичностью, 60%, при диагностике MPA. Отсутствие аутоантител к MPO и PR3, при одновременном выявлении ANA, может быть использовано в качестве инструмента для дифференциальной диагностики между AAV и SLE индуцированными васкулитами.

ВРІ (белок, превышающий проницаемость).

Белок, превышающий проницаемость, ВРІ, это мембранный белок, классифицируемый как ANCA-антиген полиморфно-ядерных гранулоцитов и моноцитов, которые связывают эндотоксин. Аутоантитела к нему в настоящий момент классифицируются как сANCA. Из-за высокой аффинности ВРІ к липополисахаридам он обладает значительным антимикробным эффектом по отношению к грамотрицательным бактериям. ВРІ расщепляется и таким образом инактивируется под воздействием эластазы или другой сериновой протеазы. Аутоантитела к ВРІ практически всегда выявляются при хронических заболеваниях кишечника, болезни Крона или язвенных колитах. В отличие от анти-MPO и анти-PR3 аутоантител, аутоантитела к ВРІ никак не связаны с васкулитами.

Эластаза

Эластаза – это сериновая протеаза, ее первичная последовательность на 54% гомологична протеиназе 3. Она встречается в основном в полиморфно-ядерных нейтрофильных гранулоцитах (PMN), в макрофагах и эндотелиальных клетках. Расщепление протеогликанов нейтрофилами происходит в основном благодаря протеолитической активности эластазы. Более того, эластаза активно участвует в деструкции ткани, связанной с эмфиземой и ревматоидным артритом. Аутоантитела к этому антигену обычно ассоциированы с воспалительными ревматоидными заболеваниями, ревматоидным артритом и васкулитом.

Катепсин G

Катепсины принадлежат к группе внутриклеточных протеаз, в основном обнаруживаемых в лизосомах, в особенности в селезенке, печени и почках. Катепсин G это сериновая протеаза и дополнительный рANCA антиген. Он участвует в большей части в деструкции костной ткани из-за своих гидролитических свойств. Аутоантитела к катепсину G встречаются в основном при коллагенозах и других сходных воспалительных заболеваниях, ревматизме, СКВ, синдроме Шегрена и синдроме Фелти.

Лизоцим.

Лизоцим – это гликозидаза, которая расщепляет гликозидную связь между C-1 MNAc и C-4 GlcNAc. Лизоцим локализуется в азурофильных, а также специфических гранулах нейтрофилов и во внеклеточных жидкостях, таких как слезы и слюна, где он проявляет свою антимикробную активность по отношению к проникающим бактериям. LZ также относится к рANCA и аутоантитела к лизоциму встречаются с высокой частотой при ревматоидном васкулите и воспалительных заболеваниях пищеварительного тракта, например, при язвенных колитах.

Лактоферрин

Лактоферрин (LF) это железосвязывающий гликопротеин, который присутствует в высоких концентрациях в секретах слизистых оболочек, в слезной жидкости и молоке. LF также хранится в специфических гранулах полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов (PMN) и секретируется (экзоцитоз) при активации PMN. Во время активного воспалительного заболевания может быть измерен повышенный уровень LF в сыворотке. Физиологический антимикробный эффект лактоферрина зависит от его железосвязывающей способности, так как большинству бактерий необходимо железо для их собственного метаболизма. LF ингибирует миелопоэз, препятствует активации комплемента и образованию гидроксильных радикалов. Вполне возможно, что LF играет много важных ролей, таких как секреторный IgA, как неспецифический противовоспалительный защитный фактор поверхности слизистых оболочек. LF относится к рANCA, в зависимости от перераспределения из гранул к ядрам в ходе фиксации этанолом.

Аутоантитела к лактоферрину встречаются с высокой частотой у пациентов с ревматоидными васкулитами (RV), язвенными колитами (CU) и первичным склерозирующим холангитом (PSC).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом катепсина G. Присутствующие в образцах антитела к катепсину G связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания.

Развитие окраски останавливается добавлением кислого стоп-раствора, при этом окрашивание меняется на желтое. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации аутоантител IgG к катепсину G в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики in vitro.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора 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.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Стоп-раствор содержит фосфорную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
 8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
 9. Не отбирайте образцы ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Соблюдайте рекомендации по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях, тестируйте контроли и/или пулированные сыворотки. При работе со всеми компонентами набора соблюдайте существующие локальные правила работы лаборатории..

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

компонент набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых особо чистым препаратом катепсина G	1
Комбинированные стандарты с IgG антителами к катепсину G (A-F) в сывороточно/буферном (PBS/BSA, NaN3 <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; и 100 Ед/мл Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к катепсину G в сывороточно-буферном (PBS/BSA, NaN3 <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% фосфорная кислота). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буфер для промывок, концентрат 50x, Готов к использованию	1 флакон 20 мл

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл

Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Лабораторный таймер

программное обеспечение для анализа результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.

3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°С) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разведите содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.

Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от А до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28°C)

4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку.

5. Добавьте по 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.

6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку.

8. Добавьте по 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.

9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.

11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Cathepsin G ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1) Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору.

Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации сплайнами.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерения в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X.

Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании нормального диапазона значений анти- катепсин G антител в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

анти-катепсин G IgG [Ед/мл]

норма: < 10

повышенные значения:

≥ 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к катепсину G.

Калибраторы

No	Пози- ция	ОП 1	ОП 2	Ср.з наче ние	Кон ц 1	Кон ц 2	Сред -нее	Ожи д.	CV %
ST A 1/B		0,0	0,03	0,03	0,1	0,1	0,1	0,0	3
A 1		36	7	7					
ST C 1/D		0,4	0,42	0,42	6,2	6,2	6,2	6,3	0
B 1		23	5	4					
ST E 1/F 1		0,7	0,74	0,73	12,5	13,2	12,9	12,5	3
C		16	4	0					
ST G 1/H		1,1	1,13	1,11	24	25	24	25	2
D 1		01	2	6					
ST A 2/B		1,6	1,63	1,64	51	50	51	50	1
E 2		60	7	9					
ST C 2/D		2,1	2,15	2,14	99	101	100	100	0
F 2		37	1	4					

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией анти-катепсин G IgG антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом. Показана линейность метода на всем диапазоне измеряемых значений.

Чувствительность

Нижняя граница определения для данного метода определения анти-катепсин G IgG антител составляет 0.5 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт особо чистым препаратом катепсина G. Препарат катепсина G очищен с помощью аффинной хроматографии. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к катепсину G.

Не наблюдалось перекрестной реактивности ни с каким другим ANCA антигеном.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к катепсину G, тест-система прокалибрована в относительных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный метод ORGENTEC Anti-Cathepsin G ELISA может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (495) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к катепсину G

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

трижды промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

трижды промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и

промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения аутоантител к лизоциму Anti-LYSOZYME

АЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC Anti-LYSOZYME предназначен для количественного определения тител класса G против лизоцима в человеческой сыворотке или плазме. Этот метод предназначен лько для диагностики in vitro.

ЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Термином “Антитела к цитоплазме нейтрофилов” (ANCA) обозначают антитела, ецифичные к цитоплазматическим антигенам гранулоцитов, моноцитов и, возможно, дотелиальных клеток.

Протеиназа 3 и миелопреоксидаза были определены как надежные серологические маркеры я группы первичных системных васкулитов (PSV), также имеющих другое название – ANCA-социированные васкулиты. Частота антител к цитоплазме нейтрофилов оказалась выше, чем едполагалось: от 1,5 случаев на 1000 лиц в среднем до 5:1000 среди лиц старшего возраста.

Клиническая манифестация ANCA-ассоциированной патологии проявляется поражением гких, дыхательных путей и почек. В последние годы новые были охарактеризованы несколько вых рANCA-антигенов (перинуклеолярные ANCA): эластаза, катепсин G, лизоцим и лактоферрин.

До настоящего времени скрининг ANCA проводился иммунофлуоресцентным методом, при м часто интерпретация результатов была затруднительна. Следовательно, результаты ыходилось перепроверять на дургих клеточных линиях или с помощью иммуноферментного анализа. Определение отдельных антигенов сANCA и рANCA было невозможно.

Протеиназа 3:

Основной антиген сANCA-реактивности представляет собой нейтральную сериновую протеазу (синонимы – p29, AGP7, аутоантиген Вегенера) из семейства трипсина/химотрипсина Данные 1988 г. - молекулярная масса 29 kDa. В 1973 Ohlsson и Olsson данный фермент был описан как нейтрофильная коллагеназа. Было показано, что антитела к PR3 являются являются высокоспецифичным серологическим маркером гранулематоза Вегенера (специфичность в начальной фазе составляет 50%, в генерализованной фазе – более 90%). Наблюдается корреляция между концентрацией аутоантител и активностью болезни.

Миелопероксидаза:

В примерно 60% случаев обнаружения рANCA главным антигеном является миелопероксидаза (МРО). Антитела к МРО классифицируются как значимый маркер быстро прогрессирующего нефрита. Также они встречаются у 70-90% пациентов с серьезным повреждением почек. Данные антитела встречаются при синдроме Чардж-Стросса, микроскопическом полиангиите (МПА) и других васкулитах. Концентрация аутоантител коррелирует с активностью МПА. МПА характеризуется клинической манифестацией в легких, почках, респираторном тракте, однако эти манифестации не носят гранулематозного характера, как при гранулематозе Вегенера.

Специфичность антител к МРО при МПА не такая высокая, как у антител против пенициллина 3 при гранулематозе Вегенера и составляет 60%. Отсутствие аутоантител к МРО и PR3 при одновременном определении антинуклеарных антител может использоваться для дифференциальной диагностики ANCA-ассоциированных васкулитов и васкулитов при СКВ.

ВР1: ВР1 (бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость) представляет собой мембранный белок и является ANCA-антигеном полиморфноядерных гранулоцитов и моноцитов, которые выделяют эндотоксин. Аутоантитела к данному антигену в настоящее время классифицируются как ANCA. Высокое сродство ВР1 к липополисахаридам обуславливает его бактерицидный эффект в отношении грамотрицательных бактерий. ВР1 расщепляется и инактивируется эластазой и другими сериновыми протеазами. Аутоантитела к ВР1 превалируют над всеми определяемыми аутоантителами при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта, таких как болезнь Крона и язвенный колит. В отличие от антител к МРО и PR3 антитела к ВР1 не обнаруживают связи с васкулитами.

Эластаза:

Эластаза представляет собой сериновую протеазу со степенью гомологии 54% по отношению к PR3. Фермент встречается в основном в полиморфноядерных нейтрофильных гранулоцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках. Разрушение протеогликанов нейтрофилами обусловлено в основном действием эластазы. Кроме того, эластаза играет решающую роль в разрушении тканей при эмфиземе и ревматоидном артрите. Аутоантитела к данному антигену ассоциированы в основном с воспалительными ревматическими заболеваниями, то есть ревматоидным артритом и васкулитами.

Катепсин G:

Катепсины относятся к группе внутриклеточных протеаз, локализованных в основном в лизосомах, преимущественно в селезенке, печени, почках. Катепсин G представляет собой сериновую протеазу и рANCA-антиген. Он играет значительную роль в разрушении костной ткани благодаря своим гидролитическим свойствам.

Аутоантитела к катепсину G встречаются в основном при коллагенозах и других воспалительных ревматических заболеваниях – СКВ, синдром Сьегрена и синдром Фелти.

Лизоцим:

Лизоцим представляет собой гликозидазу, осуществляющую гидролиз (1,4)-гликозидной связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозаминовыми остатками мукопептида в клеточных стенках бактерий. Фермент локализован в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов, а также во внеклеточных средах: в слюне и слезах, где он проявляет бактерицидную активность. Лизоцим является рANCA-антигеном, антитела к нему с высокой частотой встречаются при ревматоидном васкулите и воспалительных заболеваниях, например при язвенном колите.

Лактоферрин:

Лактоферрин является железосвязывающим белком, присутствующим в высоких концентрациях в секретах слизистых оболочек, в слезах и молоке. Также лактоферрин присутствует в гранулах полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов, откуда выделяется экзоцитозом при их активации. Повышенный сывороточный уровень лактоферрина определяется при активных воспалительных процессах. Физиологический антимикробный эффект лактоферрина связан с его железосвязывающей способностью, поскольку железо необходимо большинству бактерий для роста и развития. Лактоферрин ингибирует миелопоэз, предупреждает активацию комплемента и образование гидроксил-радикалов. Вероятно, лактоферрин служит неспецифическим противовоспалительным фактором защиты слизистых наряду с секреторным IgA. Лактоферрин является рANCA-антигеном, его свечение зависит от перераспределения гранул по отношению к ядру при фиксации этанолом. Аутоантитела к лактоферрину с высокой частотой встречаются у пациентов с ревматоидным васкулитом, язвенным колитом и первичным склерозирующим холангитом.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В лунках планшета сорбирован высоко очищенный антиген лизоцим. В ходе анализа происходят связывание присутствующих аутоантител. Промывочный раствор удаляет несвязавшиеся

компоненты сыворотки. Раствор конъюгата анти-IgG человека - пероксидаза хрена связывается с антителами пациента с формированием иммунного комплекса антиген/антитела/конъюгат. Связавшийся ферментный конъюгат удаляется промывочным раствором. Хромогенный раствор субстрата, содержащий ТМБ, в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетс с образованием глубокого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислого стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце и измеряется при 450 нм.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора 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 крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп-раствор содержит фосфорную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для разбавления образцов и промывочный буферный раствор) содержат азид натрия в качестве консервантов. Азид натрия (NaN_3) высоко токсичное и активное в чистом виде вещество. В той концентрации, в которой он находится в компонентах набора, он не опасен. Несмотря на это производители набора настоятельно рекомендуют с осторожностью использовать набор (пп 7,8,9)
- Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При смыве в канализацию рекомендуется разбавлять отходы большим количеством воды для снижения активного уровня.
- Во время работы пользуйтесь одноразовыми перчатками и тщательно мойте руки после работы.
- Не отбирайте образцы ртом
- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить и пользоваться косметикой.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях для использования контролей и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови следуйте локальным юридическим руководствам.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, сорбированный высоко очищенным лизоцимом, помещенный в пакет из фольги с осушителем. Готов для использования.	1
Калибраторы IgG-антител к лизоциму (A-F) в сыворотка/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), содержащие следующие концентрации: 0; 6.3; 12.5, 25; 50 и 100 Е/мл. Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к лизоциму в сыворотка/ буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$): положительный (1)	2 флакона 1,5 мл каждый

трицательный контроль (2), точные концентрации указаны во адыше к набору. овы для использования.	
буфер образцов (Tris буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), желтый, концентрат 5х	1 флакон 20 мл
раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, Проклин $0,5\%(\text{v/v})$) (светло-красный), содержащий поликлональные количьи анти-IgG человека антитела, меченные пероксидазой хрена. отов для использования.	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (фосфатно-солевой буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$, концентрат 50х	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

- Хранить при 2 - 8 °C
- Ячейки микропланшета хранятся в пакете с осушителем
- Компоненты набора стабильны до срока годности, указанного на этикетках.
- Беречь реагенты от воздействия тепла, солнца и яркого света при хранении и использовании.
- Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °C

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер
- Лабораторный таймер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 $\mu\text{л}$
- Вортекс
- программное обеспечение для ридера

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Соберите образец цельной крови стандартной венопункцией, избегая гемолиза.
- Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием
- Избегайте гемолиза, липемии или микробиологического загрязнения сыворотки
- Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения до шести месяцев образцы следует заморозить при -20°C.
- Для предотвращения повторных циклов замораживания-оттаивания (это может привести к потере активности антител) следует приготовить аликвоты образцов.
- Все пробы сыворотки и плазмы должны быть разбавлены 1:100 буфером для образцов. Следовательно, 10 мкл образца могут быть разбавлены 1000 мкл буфера.
- Использование для анализа инактивированной нагреванием сыворотки не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ по выполнению анализа

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°C).
- Подготовьте все реагенты и образцы перед началом работы. Начав работать, выполняйте все шаги анализа без задержек для получения надежных и воспроизводимых результатов.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеразбавленные образцы.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Избегайте контаминации переносом образца в соседние ячейки – используйте одноразовые наконечники для каждого образца и реагента.
- Качественная промывка принципиальна для результата анализа, удаляйте оставшиеся капли полностью после промывки.
- Точно соблюдайте длительность инкубаций
- Контрольные образцы или пулированные сыворотки анализируйте как неизвестные для проверки работы реагентов и выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Используйте эти значения для построения калибровочной кривой, если хотите рассчитать результаты полуколичественно

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.
- Приготовление буферного промывочного раствора
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.
- Приготовление образцов
- Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разбавленных проб пациентов.
2. Добавьте в ячейки 100 мкл контролей, калибраторов и предварительно разбавленных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
a	S	SE	P1	P5		SA-SF -
	A					стандарты от

b	S A	SE	P1	P5		A до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28°C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и дайте постоять 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

интерпретация РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест считается валидным при условии, что измеренные величины оптической плотности при 450 нм отрицательного и положительного контролей согласуются с диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, вложенном в набор. Если критерии не выполняются, результаты анализа считаются недостоверными, и анализ необходимо повторить.

Расчет результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации. Может быть также использована аппроксимация Smoothed Spline и log-log координаты.

Для ручного расчета рекомендуется линейно-логарифмическая миллиметровая бумага. Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровую бумагу и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Ожидаемые значения

При изучении нормального диапазона использовались образцы сыворотки из крови здоровых доноров, и был установлен следующий диапазон значений для антител против лизоцима:

	IgG-антитела к лизоциму, Ед/мл
Нормальный уровень:	< 10
Повышенный уровень:	> 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к лизоциму. Значения выше референсного диапазона должны рассматриваться только как ориентировочные.

Калибраторы									
No	Пози- ция	ОП 1	ОП 2	Ср.з наче ние	Кон ц 1	Кон ц 2	Сред -нее	Ожи д. конц	CV %
ST A 1/B		0,0	0,03	0,03	0,1	0,1	0,1	0,0	3
A 1		36	7	7					
ST C 1/D		0,4	0,42	0,42	6,2	6,2	6,2	6,3	0
B 1		23	5	4					
ST E 1/F 1		0,7	0,74	0,73	12,5	13,2	12,9	12,5	3
C		16	4	0					
ST G 1/H		1,1	1,13	1,11	24	25	24	25	2
D 1		01	2	6					
ST A 2/B		1,6	1,63	1,64	51	50	51	50	1
E 2		60	7	9					
ST C 2/D		2,1	2,15	2,14	99	101	100	100	0
F 2		37	1	4					

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями IgG-антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. Анализ был линеен во всем диапазоне измерения.

Чувствительность

Минимально определяемый предел для анти-лизоцим – 0,5 Е/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высоко очищенным методом аффинной хроматографии лизоцимом. Тест специфичен только для аутоантител к этому антигену. Перекрестных реакций с другими ANCA-антигенами не наблюдалось.

КАЛИБРОВКА

До тех пор, пока не существует международно признанного стандарта для антител к лизоциму, стандарты прокалиброваны в относительных арбитражных единицах.

Ограничения метода

Набор следует использовать как дополнительный диагностический метод, но он не должен использоваться как основной и единственный. Диагностика не может основываться на результате единственного теста, такой результат должен оцениваться клиницистами только в совокупности с информацией, полученной от других клинических и лабораторных исследований.

Интерференции

наблюдалась интерференция для следующих случаев:

гемолиз	до 1000 мг/дл
липемия	до 3 г/дл триглицеридов
билирубин	до 40 мг/дл
антикоагулянты	в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

определение антител к лизоциму

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к лактоферрину Anti-Lactoferrin

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Акроним ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела) определяет суммарные аутоантитела, специфические к различным гранулоцитарным, моноцитарным и, возможно, эндотелиальным цитоплазматическим антигенам.

PR3 и MPO хорошо известны как надежные серологические маркеры для определенной группы первичных системных васкулитов (PSV), также известных как ANCA-ассоциированные васкулиты (AAV). Заболеваемость AAV очевидно выше, чем предполагается. Встречаемость составляет 1.5 на 1000, а в группе пожилых людей - около 5 случаев на 1000. Клиническое появление AAV характеризуется обнаружениями в легких, почках и дыхательном тракте. В последние годы новые исследования выявили и охарактеризовали некоторые новые рANCA антигены: эластазу, катепсин G, лизоцим и лактоферрин.

До настоящего времени скрининг ANCA проводили с помощью иммунофлуоресцентных методов, но при этом часто сталкивались со сложностями при оценке результатов и клинических данных этих методов цитоплазматическим антигенам. Поэтому результаты должны быть тщательно изучены с использованием количественных исследований, на других клетках или другими методами, подобными ELISA. Более того, не представляется возможным дифференцировать отдельные сANCA и рANCA антигены.

Протеиназа 3

Основным антигеном, определяющим реактивность сANCA является нейтральная сериновая протеаза 3, (синонимы: p29, AGP7, аутоантиген Вегенера), принадлежащая семейству трипсинов/химотрипсинов. В 1988 несколько групп исследователей показали, что антигеном является протеин с молекулярной массой 29 кДа. PR3 уже была описана в 1973 году исследователями Ohlsson и Olsson под названием коллагеназа нейтрофилов. Между тем считается доказанным, что аутоантитела к PR3 являются высокоспецифичным серологическим маркером при диагностике гранулематоза Вегенера (специфичность: начальная стадия 50%, генерализация > 90%). Более того, существует корреляция между концентрацией аутоантител и активностью заболевания.

Миелопероксидаза

Миелопероксидаза является основным антигеном примерно в 60% случаев выявления рANCA. Присутствие аутоантител к MPO классифицируется как надежный маркер быстро прогрессирующего нефрита. Более того, эти аутоантитела присутствуют у 70-90% всех пациентов, страдающих серьезными нарушениями функций почек. В добавок они выявляются при синдроме Черджа-Строса (CSS), микроангиопатии (МРА) и васкулитах. Концентрация антител хорошо коррелирует с активностью МРА. МРА также характеризуется клиническими проявлениями в легких, почках и дыхательном тракте, но эти проявления, в отличие от WG, не гранулематозные. Однако, эти антитела, в отличие от высокоспецифичных к WG антител к PR3, имеют более низкую специфичность, 60%, при диагностике МРА. Отсутствие аутоантител к MPO и PR3, при

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, в лунках которого сорбирован высокочистый лактоферрин. Если антитела к этому антигену присутствуют в разведенных образцах сыворотки или плазмы, то они связываются с иммобилизованным в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки или плазмы. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуются комплексы конъюгат/антитело/антиген. Избыток конъюгата удаляется при следующей промывке.

Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетс с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора, при этом цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg 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.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Стоп-раствор содержит фосфорную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
 8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
 9. Не пипетируйте ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокочистым лактоферрином. Готов к использованию	1

Комбинированные стандарты с IgG антителами к лизоциму (A-F) в сывороточно/буферном (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие: IgG: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 Ед/мл Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к лактоферрину в сывороточно-буферном (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Промывочный буфер, концентрат 50x	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
 - Вортекс
 - Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
Лабораторный таймер
программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения буфера для промывок

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.

6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все реагенты и образцы на дно лунок
8. Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление промывочного буфера
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление образцов
- Разведите все образцы сывороток пациентов в 100 раз буфером для образцов перед исследованием. Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.
- Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных проб сывороток пациентов в дублях.
2. Добавьте в соответствующие ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов.

	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...C: образцы сыворотки или плазмы пациентов 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Lactoferrin ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах
Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

Примет расчетов

В таблице ниже приведены типичные результаты, полученные при анализе данным методом Anti-Lactoferrin ELISA. Эти данные приведены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов какого-либо анализа.

Стандарты									
No	Позиция	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее конц.	декл. конц.	CV %
STA	A 1 / B 1	0.036	0.037	0.037	0.1	0.1	0.1	0.0	3
STB	C 1 / D 1	0.423	0.425	0.424	6.2	6.2	6.2	6.3	0
STC	E 1 / F 1	0.716	0.744	0.730	12.5	13.2	12.9	12.5	3
STD	G 1 / H 1	1.101	1.132	1.116	24	25	24	25	2
STE	A 2 / B 2	1.660	1.637	1.649	51	50	51	50	1
STF	C 2 / D 2	2.137	2.151	2.144	99	101	100	100	0

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к лактоферрину в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

Анти-лактоферрин IgG [Ед/мл]:

норма: < 10

повышенные значения: ≥ 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к лактоферрину. Приведенный референсный диапазон должен использоваться только как ориентировочный.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разведению сыворотки с высокой концентрацией антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом Anti-Lactoferrin. Тестирование показало линейность метода во всем измеряемом диапазоне.

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к лактоферрину составляет 0.5 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт высокочистым лактоферрином. Очистка антигена проводилась с помощью аффинной хроматографии. Данный тест специфичен только по отношению к аутоантителам к лактоферрину. Не наблюдалось какой-либо перекрестной реактивности с другими ANCA антигенами.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к лактоферрину, тест-система прокалибрована в условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Lactoferrin ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

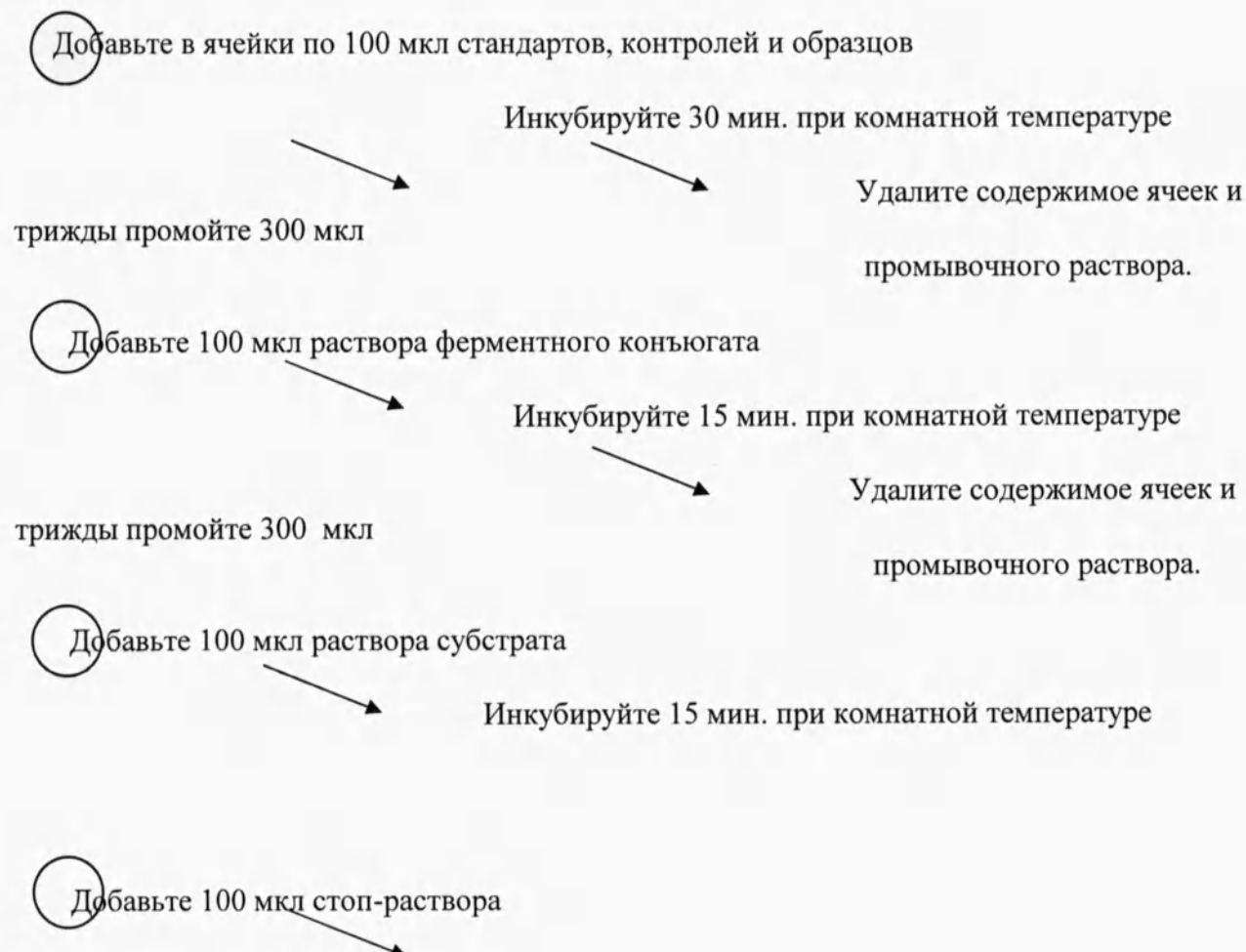
Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,
ЗАО "БиоХимМак"
тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
факс (095) 939-09-97
E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к лизоциму



Всего прошито
и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения суммарных антител к кардиолипину, фосфатидил-серину, фосфатидил-инозитолу, фосфатидиловой кислоте и β 2-гликопротеину I (классов IgG и/или IgM) АНТИ-ФОСФОЛИПИД СКРИН IgG / IgM.

Инструкция пользователя

НАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM предназначен для количественного определения или IgM аутоантител к кардиолипину, фосфатидил серину, фосфатидил - инозитолу, ратидиловой кислоте и β 2-гликопротеину I в сыворотке или плазме человека методом иммуноферментного анализа (EIA). Набор предназначен только для диагностики риска возникновения бозов у пациентов, больных системной красной волчанкой или волчаночными заболеваниями.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Исследование антител к фосфолипидам началось в 1906 году с введением Вассерманом серологического теста на сифилис. В 1942 году обнаружена фосфолипидная природа антигена, названного кардиолипином. К 1950 году выяснилось, что многие люди обнаруживали положительный тест на сифилис без клинических проявлений заболевания. Данное явление было названо биологическим ложноположительным серологическим тестом на сифилис. В группе таких пациентов была обнаружена высокая частота аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку и синдром Шегрена.

Наличие циркулирующего антикоагулянта у пациентов с системной красной волчанкой было впервые обнаружено в 1952 году и ассоциировано с повышенным риском пародоксального тромбоза в 1963 году. Термин "волчаночный антикоагулянт", введенный в 1972 году, не вполне корректен, так как чаще обнаруживается у пациентов без волчанки и ассоциирован более с тромбозом, чем с патологическим кровотечением.

В последнее время стало известно, что кофактором антикардиолипиновых антител является β 2-гликопротеин I. β 2-гликопротеин I (аполипопротеин H) представляет собой β 2-глобулин с молекулярной массой 50 килодальтон, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. Обнаружено, что β 2-гликопротеин I ингибирует внутренний путь свертывания, участвуя тем самым в регуляции свертывания крови. β 2-гликопротеин I in vivo ассоциирован с отрицательно заряженными частицами - анионными фосфолипидами, гепарином и липопротеинами. Участок связывания фосфолипидов находится в пятом домене молекулы.

Термином "антитела к фосфолипидам" обозначаются суммарные антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам, таким как кардиолипин, волчаночный антикоагулянт, фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота. Из этих соединений кардиолипин наиболее часто используется в качестве антигена в ИФА-тестах на антитела к фосфолипидам. Некоторые антисыворотки, реагирующие с ИФА-ячейками, покрытыми кардиолипином, могут реагировать с

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенными человеческими фосфо-липидами (кардиолипином, фосфатидил-серином, фосфатидил-инозитолом, фосфатидиловой кислотой) и насыщенными высоко очищенным человеческим β 2-гликопротеином I. Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы с антителами к фосфолипидам классов IgG и IgM в фосфатно-белковом матриксе (PBS, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ (w/w)) содержащие: 6 флаконов IgG: 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 GPL Ед/мл и 1 мл каждый IgM: 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 MPL Ед/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов, 1,5 мл каждый
Контроли антител к фосфолипидам в фосфатно-белковом матриксе (PBS, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ (w/w)), (положительный и отрицательный), концентрации 2 флакона указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона, 1.5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ (w/w), (желтый), концентрат (5x).	1 флакон, 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 $< 0.5\%$ (v/v) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон, 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 $< 0.5\%$ (v/v) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgM антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ (w/w), концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
 - Вортекс
 - Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл
- Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л

аторный таймер
амное обеспечение для анализа данных
готовление реагентов
тиллированная вода
ные цилиндры на 100 и 1000 мл
астиковый контейнер для хранения промывочного буфера

ОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
- Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление промывочного буфера
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПОРЯДОК АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов сывороток пациентов.

Добавьте в соответствующие ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов в дублях.

Для определения IgG, и IgM-аутоантител одновременно необходимо вносить в лунки планшета стандарты, контроли и образцы пациентов независимо для каждого вида антител: т.е. отдельно для IgG-антител, и отдельно для IgM-антител (два независимых вида анализа в постановке профилем) по предложенной ниже схеме:

	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 от A до F

P1, P2...: образцы сывороток пациентов 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте каждую лунку 300 мкл промывочного буфера.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата (анти-человеч. IgG или анти-человеч. IgM в каждую ячейку).
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору! Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах.

рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

читайте среднюю оптическую плотность для каждого стандарта по результатам измерений в лунках, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите максимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител классов IgG и IgM к фосфолипидам. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (СТ)										
Ан тит	No	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср едн ее	Ко нц 1	Ко нц 2	Ср едн ее	Зая в. кон	С V %
IgG	ST A	1/B	0.05	0.04	0.0	0.3	0.1	0.2	0.0	3
	A	1	1	9	50					
IgG	ST C	1/D	0.16	0.16	0.1	6.4	6.3	6.3	6.3	1
	B	1	3	0	61					
IgG	ST E	1/F	0.31	0.27	0.2	12.	11.	12.	12.	9
	C	1	0	3	91	8	2	0	5	
IgG	ST G	1/H	0.60	0.63	0.6	25	26	26	25	3
	D	1	3	0	16					
IgG	ST A	2/B	1.12	1.05	1.0	51	47	49	50	4
	E	2	2	4	88					
IgG	ST C	2/D	1.74	1.78	1.7	98	103	101	100	2
	F	2	2	7	65					
Ig M	ST A	7/B	0.02	0.02	0.0	0.2	0.1	0.2	0.0	3
	A	7	2	1	22					
Ig M	ST C	7/D	0.21	0.20	0.2	6.1	6.0	6.1	6.3	2
	B	7	1	5	08					
Ig M	ST E	7/F	0.46	0.46	0.4	13.	12.	13.	12.	0
	C	7	5	2	64	0	9	0	5	
Ig M	ST G	7/H	0.78	0.87	0.8	23	26	24	25	8
	D	7	8	9	33					
Ig M	ST A	8/B	1.41	1.38	1.3	52	50	51	50	1
	E	8	1	2	97					
Ig M	ST C	8/D	1.86	1.85	1.8	101	98	99	100	1
	F	8	8	2	60					

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании нормального диапазона значений антител к фосфолипидам с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

Антитела к фосфолипидам		
	IgG [GPL	IgM [MPL
	Ед/мл]	Ед/мл]

нормальный	<10	<10
повышенный	≥10	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.
Рекомендуется определять нормальные и патологические уровни сывороточных антител к фосфолипидам в каждой лаборатории.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к $\beta 2$ -гликопротеину I классов IgG и IgM были разведены в буфер для образцов и проанализированы. Результаты были линейными во всем диапазоне измерения.

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к фосфолипидам классов IgG и IgM составляет 0.5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенными человеческими фосфолипидами (кардиолипином, фосфатидил-серином, фосфатидил-инозитолом, фосфатидиловой кислотой) и высокоочищенным человеческим $\beta 2$ -гликопротеином I. Специальная технология нанесения антигенов в ячейки гарантирует нативную иммуогенную структуру фосфолипидов после иммобилизации на твердой фазе. Данный набор специфичен для аутоантител к фосфолипидам или комплексу отрицательно заряженных фосфолипидов с $\beta 2$ -гликопротеином I.

Перекрестных реакций с антителами к ДНК или другими сифилис-специфичными антителами не отмечено.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данная тест-система может быть использована как часть диагностической процедуры. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к фосфолипидам (IgG/IgM)

100 μ л	Добавить стандарты в микроячейки
-------------	----------------------------------

100 μ л пациента	Контроли или пробы
----------------------	--------------------

☐

☐

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

☐

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

☐

Добавить конъюгата	100 мкл	раствора ферментного
--------------------	---------	----------------------

убировать 15 минут при комнатной температуре

- 3) вылить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

кубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

удержать 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011г.

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам _____
Подпись _____

Подпись



Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения аутоантител класса G к париетальным клеткам желудка
Anti-Parietal Cell

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC Anti-Parietal Cell (H+/K+-ATPase) предназначен для количественного определения аутоантител класса IgG к α - и β -субъединицам H+/K+-АТФазы париетальных клеток желудка. Этот метод предназначен только для диагностики in vitro.

ИСТОРИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Циркулирующие аутоантитела к париетальным клеткам желудка впервые обнаружены у больных с пернициозной анемией с использованием реакции связывания комплемента, описанной Taylor et al., 1962, а впоследствии с использованием теста иммунофлуоресценции (Taylor et al., 1962). Аутоантитела к париетальным клеткам желудка расположены на секреторных канальцах и микросомах париетальных клеток желудка. Дальнейшие биохимические и молекулярные исследования позволили идентифицировать в качестве антигена α - и β -субъединицы H+/K+-АТФазы париетальных клеток желудка.

H+/K+-АТФаза париетальных клеток желудка (ЕС 3.6.1.3) представляет собой фермент-переносчик водорода, обеспечивающий кислотность желудочного секрета (Rabon and Reuben, 1990). Он относится к семейству электронейтральных АТФ-аз Р-типа, также включающему Na/K- и Ca-АТФазы (Pederson and Carfoli, 1987). Этот антиген париетальных клеток состоит из двух субъединиц: 8-10 трансмембранных каталитических α -субъединиц (1033 аминокислотных остатка) и сильно гликозилированной β -субъединицы (с ядром в 294 аминокислотных остатка). Данная H/K-АТФаза имеет высокую степень гомологии аминокислотной последовательности у разных видов (van Driel and Callaghan, 1995).

Пернициозная анемия в западных популяциях наиболее распространенная причина дефицита витамина В12. Длительные исследования показали, что пернициозная анемия является конечной стадией хронического атрофического гастрита типа А (Irvine et al. 1974), характеризующегося патологическими изменениями дна и тела желудка, включая атрофию слизистой оболочки, селективное исчезновение париетальных и главных клеток из слизистой, а также лимфоцитарную инфильтрацию подслизистой (Whittingham and Macsckay, 1985).

Пернициозной анемией в основном страдают белые обитатели северной Европы средних лет, у женщин заболевание обнаруживается чаще, чем у мужчин. Лица, страдающие данным заболеванием, выглядят бледными, с признаками физического истощения и депрессии. Пернициозная анемия ассоциирована с рядом других патологий, в основном органоспецифическими аутоиммунными заболеваниями эндокринных желез, при которых также наблюдаются аутоантитела к другим тканеспецифичным антигенам. Примером являются тиреоидит Хашимото, диабет 1 типа и первичная болезнь Аддисона (Whittingham and Macsckay, 1985). Поздние стадии пернициозной анемии также могут быть ассоциированы с периферической нейропатией и подострой комбинированной дегенерацией спинного мозга вследствие дефицита витамина В12.

Аутоантитела к H/K-АТФазе могут обнаруживаться у 80-90% пациентов с пернициозной анемией с использованием метода иммунофлуоресценции, они также обнаруживаются у 2-5% здоровой взрослой

ситуации. Тест-системы ELISA обнаруживают чувствительность около 80% и специфичность около 80%. Частота обнаружения аутоантител к париетальным клеткам во взрослой популяции коррелирует с возрастом. Изучение взаимосвязи аутоантител к париетальным клеткам и морфологии слизистой желудка обнаружило, что лица из случайной популяции, позитивные по наличию аутоантител, могут иметь раннюю стадию гастрита типа А (Uibo et al., 1984). Повышенная частота встречаемости антител к париетальным клеткам (20-30%) наблюдается у пациентов с аутоиммунными эндокринными патологиями – тиреотоксикозом, тиреоидитом Хашимото, инсулинзависимым диабетом (Whittingham and Masskay, 1985). Гистологическое изучение биоптатов слизистой желудка показало, что большинство лиц, позитивных по наличию аутоантител к париетальным клеткам, имели изменения слизистой, характерные для гастрита типа А (Varis et al. 1979).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенной H+/K+-АТФазой свиньи, α - и β -субъединицы. В ходе анализа происходит связывание аутоантител к этим антигенам, присутствующим в разведенном образце сыворотки или плазмы, с соответствующим антигеном. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. При последующей инкубации с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) с антителами к человеческим IgG образуется комплекс конъюгат/антитела, присутствующие в образце/антиген. При промывке удаляется несвязавшийся конъюгат. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуетс с образованием голубого окрашивания. Добавление кислого стоп-раствора останавливает реакцию, при этом окрашивание меняется на желтое. Интенсивность получившегося желтого окрашивания, измеряемая фотометрически при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствующих в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенной H+/K+-АТФазой свиньи, α - и β -субъединицы. Готов для использования.	1
Калибраторы с антителами к париетальным клеткам в ФСБ/БСА-буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), содержащие: 6 флаконов IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл (A-F). Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к париетальным клеткам в сывороточном/буферном (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), желтый, концентрат (5x)	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, Проклин 300 $< 0,5\%(\text{v/v})$) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (фосфатно-солевой буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

- Хранить при 2 - 8 °C
- Ячейки микропланшета хранятся в пакете с осушителем
- Компоненты набора стабильны до срока годности, указанного на этикетках.
- Беречь реагенты от воздействия тепла, солнца и яркого света при хранении и использовании.
- Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °C

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер
- Лабораторный таймер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 $\mu\text{л}$
- Вортекс
- программное обеспечение для ридера

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

ПРИ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Берите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза. Сепарировать сыворотку от клеток центрифугированием после образования сгустков.

Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.

Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.

Не рекомендуется проводить тестирование дезактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ПРИМЕЧАНИЯ по выполнению анализа

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°С).
- Подготовьте все реагенты и образцы перед началом работы. Начав работать, выполняйте все шаги анализа без задержек для получения надежных и воспроизводимых результатов.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеразбавленные образцы.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Избегайте контаминации переносом образца в соседние ячейки – используйте одноразовые наконечники для каждого образца и реагента.
- Качественная промывка принципиальна для результата анализа, удаляйте оставшиеся капли полностью после промывки.
- Точно соблюдайте длительность инкубаций
- Контрольные образцы или пулированные сыворотки анализируйте как неизвестные для проверки работы реагентов и выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.
- Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Используйте эти значения для построения калибровочной кривой, если хотите рассчитать результаты полуколичественно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К), калибраторов (С) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от А до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

- Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
- Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест считается валидным при условии, что измеренные величины оптической плотности при 450 нм отрицательного и положительного контролей согласуются с диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, вложенном в набор. Если критерии не выполняются, результаты анализа считаются недостоверными, и анализ необходимо повторить.

Расчет результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

Для ручного расчета рекомендуется линейно-логарифмическая миллиметровая бумага. Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровую бумагу и отложите среднюю оптическую плотность против

ятрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя чки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

МЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе. Данные назначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других ов.

РМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений IgG-антител к париетальным клеткам с использованием данного теста у здоровых доноров получено значение cutt-off 10 Ед/мл:

	Антитела к париетальным клеткам, [Ед/мл]
ормальный уровень	<10
овышенный ровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к париетальным клеткам. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

Поз	ОП	ОП	Ср.з	Кон	Кон	Сред	Ожи	CV
н-	1	2	нач	ц 1	ц 2	-нее	д.	%
ция			ние				конц	
A	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
1/B	6	6	6					
1								
C	0,33	0,33	0,33	6,45	6,40	6,43	6,3	0,6
1/D	2	5	4					
1								
E	0,54	0,55	0,55	12,0	12,2	12,1	12,5	1,3
1/F	8	8	3					
G	0,93	0,95	0,94	25,6	24,8	25,2	25,0	1,6
1/H	4	6	5					
1								
ST A	1,41	1,38	1,39	51,0	50,0	50,5	50,0	1,2
E 2/B	0	6	8					
2								
ST C	1,82	1,84	1,83	98,3	101,	99,7	100,	1,8
F 2/D	3	0	2		1		0	
2								

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			Между сериями		
Обр	Сред	CV	Обр	Сред	CV
а-	нее	[%	а-	нее	[%]
зец	[Ед/м	]	зец	[Ед/м	]
No	л]		No	л]	
1	12,5	3,5	1	12,0	4,2
2	22,5	2,8	2	20,5	3,7
3	75,0	3,2	3	85,9	2,6

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к париетальным клеткам класса IgG – 0,5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенной Н+/К+-АТФазой париетальных клеток свиньи. Данный набор специфичен только для аутоантител к антигену париетальных клеток.

Калибровка

До тех пор, пока не появится международный референс-стандарт для антител к париетальным клеткам, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

Ограничения метода

Набор следует использовать как дополнительный диагностический метод, но он не должен использоваться как основной и единственный. Диагностика не может основываться на результате единственного теста, такой результат должен оцениваться клиницистами только в совокупности с информацией, полученной от других клинических и лабораторных исследований.

Интерференция

Показалась интерференция для следующих случаев:

в до 1000 мг/дл
ия до 3 г/дл триглицеридов
убин до 40 мг/дл
коагулянты в принятых концентрациях

на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.
J. J. Gast ov.

МА ИНКУБАЦИИ

антитела к париетальным клеткам

Добавить
100 μ л стандартов в
микрокачечки

Контроли
100 μ л контролей или проб
пациента

☐

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

Выдержать 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ " ____ 20 ____ года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011 г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgA-антител к глиадину Anti-Gliadin IgA

тестов

струкция пользователя

ЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Gliadin IgA предназначен для количественного определения IgA антител к глиадину в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики in vitro с целью диагностики целиакии.

ВЕДЕНИЕ

Серологический диагноз целиакии у детей и взрослых все больше и больше заменяет инвазивные методы биопсии. Целиакия, также известный как глютен-чувствительная энтеропатия - прежде всего болезнь, распространенная у детей. Она вызвана гиперчувствительной реакцией в ответ на поступление с пищей глиадина (глютена), белка, присутствующего во многих хлебных злаках. Это не IgE-опосредованная пищевая непереносимость ведет к тяжелым нарушениям всасывания и характеризуется полной атрофией ворсинок кишечника и гиперплазии крипт верхнего отдела тонкого кишечника.

Соблюдение безглютеновой диеты, то есть исключение всех продуктов, содержащих пшеницу, рожь, овес и ячмень, приводит к очень быстрому восстановлению слизистой, сопровождающемуся исчезновением мальабсорбции и сопутствующих клинических симптомов. Соответственно, пациенты, страдающие целиакией, должны придерживаться безглютеновой диеты всю оставшуюся жизнь

Глиадины - белки, содержащие большие количества аминокислот пролина и глутамина. Этот белок содержится в зернах пшеницы, овса, ячменя и ржи и ответственен за хлебопекарные свойства муки.

Благодаря возможности определять в сыворотке крови с высокой специфичностью и чувствительностью IgA- и IgG-антитела против глиадина можно уменьшить необходимость инвазивных процедур биопсии. В прошлом пациенты подвергались этой тяжелой процедуре несколько раз: при подозрении на целиакию, после определенного периода безглютеновой диеты, а также после теста провокации с глютенем. с того, как определенный gluten оспаривают Титр антитела к глиадину очень хорошо коррелируют с морфологическими признаками целиакии на слизистой верхнего отдела тонкой кишки. Было зарегистрировано, что снижение уровня антител происходит очень быстро после назначения безглютеновой диеты, и этот уровень повышается сразу после появления глютена в диете.

Таким образом, серологический анализ представляет собой надежный метод контроля соблюдения безглютеновой диеты пациентами, особенно детьми и подростками.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным глиадином. В ходе анализа происходит связывание аутоантител к этим антигенам, присутствующим в разведенном образце сыворотки или плазмы, с

гствующим антигеном. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. При юющей инкубации с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) с антителами к человеческим IgA ется комплекс конъюгат/антитела, присутствующие в образце/антиген. При промывке удаляется авшийся конъюгат. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуетса зованием голубого окрашивания. Добавление кислого стоп-раствора останавливает реакцию, при окрашивание меняется на желтое. Интенсивность получившегося желтого окрашивания, ряемая фотометрически при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgA тел, присутствующих в исходном образце.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы тодами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не ожет гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.

5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).

7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.

8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки

9. Не пипетируйте ртом

10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным глиадином. Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы с IgA анти-глиадиновыми антителами (A-F) в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к глиадину в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный (1) и отрицательный (2)), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл

ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло- (...)), содержащий поликлональные кроличьи антитела против IgG антител ...ка, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло- (...)), содержащий поликлональные кроличьи антитела против IgA антител ...ка, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
субстрата ТМБ. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию	1 флакон 15 мл
буфер для промывок (PBS, Na ₂ S ₂ O ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

- Храните набор при 2-8 °С.
- Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
- Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
- Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
- Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течении 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови обычной венопункцией, избегая гемолиза.
2. Дайте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Избегайте тестирования гемолизных или липемичных образцов, хотя ни гемолиз, ни липемия не влияют на результаты анализа.
4. Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней и при -20 °С до 6 месяцев.
5. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Это может привести к различным потерям активности аутиантител.
6. Не рекомендуется тестировать образцы, инактивированные нагреванием.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °С) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.

стрируйте все реагенты и образцы на дно лунок.

Избегайте перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.

Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.

Инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.

Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.

Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Готовый буфер для образцов храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление промывочного буфера
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Готовый промывочный буфер храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Подготовка образцов

Разведите все образцы в 100 раз буфером для образцов перед тестированием. Например, внесите 10 мкл образца в 990 мкл буфера для образцов, в полистироловой пробирке. Тщательно перемешайте.

Контроли уже готовы к использованию, их не требуется разводить!

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях.

	1	2	3	4	5	6
a	CA	CE	P1	P5		
b	CA	CE	P1	P5		
c	CB	CF	P2	P..		
d	CB	CF	P2	P..		
e	CC	K1	P3			
f	CC	K1	P3			
g	CD	K2	P4			
h	CD	K2	P4			

CA-CF: стандарты A - F

P1, P2...C: образцы 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

2. Внесите по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях, в соответствующие лунки.

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).

полить содержимое ячеек и трижды промыть 300 мкл промывочного буфера.
 Добавить 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
 Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
 Полить содержимое лунок и трижды промыть 300 мкл промывочного буфера.
 Добавить 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку.
 Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
 Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и выдержать 5 минут.
 Считать оптическую плотность при 450 нм и рассчитать результаты.

- Рекомендуется бихроматическое считывание с длиной волны сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
- Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Метод ORGENTEC Anti-Gliadin ELISA может быть выполнен с помощью открытого автоматического ИФА анализатора. Процедура метода, описанная выше, пригодна как для автоматического, так и для ручного выполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Анализ данных методом может считаться достоверным только в случае, если оптическая плотность положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандартов А – F, измеренная при длине волны 450 нм, попадает в диапазон допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе! Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты считаются не достоверными и тест должен быть выполнен еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgA к глиадину. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (СТ)									
№	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср. ед-нее	Кон. ц. 1	Кон. ц. 2	Ср. ед-нее	Заяв. л. Кон	С. V %
СТ А	А	0,0	0,00	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	28
А	1/В	06	9	08					
1									
СТ С	С	0,1	0,17	0,1	6,0	5,9	5,9	6,0	2
В	1/Д	80	6	78					
1									

	0,3	0,37	0,3	12	12	12	12	1
F1	67	4	71					
	0,7	0,72	0,7	25	25	25	25	1
H	13	4	18					
A	1,2	1,20	1,2	52	49	50	50	3
B	45	0	23					
C	1,7	1,73	1,7	103	97	100	100	2
D	77	7	57					

в исследовании нормального диапазона значений антител к глиадину с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

Антитела к глиадину	
	IgA [Ед/мл]
нормальный уровень	< 12
повышенный уровень	≥ 12

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к глиадину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к глиадину класса IgA были разведены буфером для образцов и проанализированы. Результаты были линейными во всем диапазоне измерения.

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к глиадину класса IgA составляет 0.5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт очищенным глиадином, выделенным из пшеницы. Данный набор предназначен для анализа только антител к глиадину.

Калибровка

Данный метод прокалиброван по сыворотке, международно признанной в качестве референсной, так как не существует другого международного стандарта.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный метод Anti-Gliadin IgA ELISA может быть использован в диагностических целях. Конечный клинический диагноз не должен основываться только на результатах отдельного теста, но должен быть поставлен врачом на основании всех клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Также не было обнаружено влияния использования различных антикоагулянтов. Однако, из практических соображений рекомендуется избегать использования сильно гемолизных или липемичных образцов.

А ИНКУБАЦИИ

титела к глиадину

Добавить 100 μ л
стандартов в микроячейки

Добавить 100 μ л контролей
или проб пациента

☐

инкубировать 30 минут при комнатной температуре

добавить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

инкубировать 15 минут при комнатной температуре

добавить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л
раствора субстрата ТМБ

☐

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

☐

Добавить 100 μ л
стоп-раствора

☐

Выдерживать 5 минут

☐

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись

удостоверяю:

Специалист по кадрам РМАПО

Подпись

« » 20 года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011 г.

Всего прошито

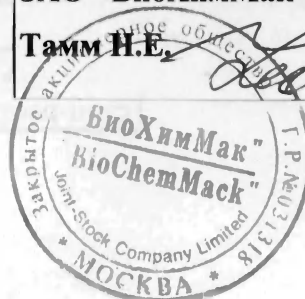
и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgG-антител к глиадину Anti-Gliadin IgG*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Gliadin IgG предназначен для количественного определения IgG антител к глиадину в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro* с целью диагностики целиакии.

ВЕДЕНИЕ

Серологический диагноз целиакии у детей и взрослых все больше и больше заменяет инвазивные методы биопсии. Целиакия, также известный как глютен-чувствительная энтеропатия - прежде всего болезнь, распространенная у детей. Она вызвана гиперчувствительной реакцией в ответ на поступление глютена (глютеина), белка, присутствующего во многих хлебных злаках. Это не IgE-опосредованная пищевая непереносимость ведет к тяжелым нарушениям всасывания и характеризуется атрофией ворсинок кишечника и гиперплазией крипт верхнего отдела тонкого кишечника.

Соблюдение безглютеновой диеты, то есть исключение всех продуктов, содержащих пшеницу, ячмень, овес и ячмень, приводит к очень быстрому восстановлению слизистой, сопровождающемуся исчезновением мальабсорбции и сопутствующих клинических симптомов. Соответственно, пациенты, страдающие целиакией, должны придерживаться безглютеновой диеты всю оставшуюся жизнь.

Глиадины - белки, содержащие большие количества аминокислот пролина и глутамина. Этот белок содержится в зернах пшеницы, овса, ячменя и ржи и ответственен за хлебопекарные свойства муки.

Благодаря возможности определять в сыворотке крови с высокой специфичностью и чувствительностью IgA- и IgG-антитела против глиадина можно уменьшить необходимость инвазивных процедур биопсии.

В прошлом пациенты подвергались этой тяжелой процедуре несколько раз: при подозрении на целиакию, после определенного периода безглютеновой диеты, а также после теста провокации с глютенем. с того, как определенный gluten оспаривают Титр антитела к глиадину очень хорошо коррелируют с морфологическими признаками целиакии на слизистой верхнего отдела тонкой кишки.

Было зарегистрировано, что снижение уровня антител происходит очень быстро после назначения безглютеновой диеты, и этот уровень повышается сразу после появления глютена в диете. Таким образом, серологический анализ представляет собой надежный метод контроля соблюдения безглютеновой диеты пациентами, особенно детьми и подростками.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным глиадином. В ходе анализа происходит связывание аутоантител к этим антигенам, присутствующим в разведенном образце сыворотки или плазмы, с соответствующим антигеном. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. При последующей инкубации с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) с антителами к человеческим IgG образуется комплекс конъюгат/антитела, присутствующие в образце/антиген. При промывке удаляется несвязавшийся конъюгат. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуются

ованием голубого окрашивания. Добавление кислого стоп-раствора останавливает реакцию, при окрашивание меняется на желтое. Интенсивность получившегося желтого окрашивания, измеряемая фотометрически при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgG, присутствующих в исходном образце.

ВНИМАНИЕ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы людьми, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно мойте водой с мылом.

Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно мойте водой и обратитесь к врачу.

Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).

Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.

При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки

9. Не пипетируйте ртом

10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным глиадином. Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы с IgG анти-глиадиновыми антителами (A-F) в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) содержащие: IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к глиадину в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) (положительный (1) и отрицательный (2)), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN_3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл

раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), желто-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела против IgG антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), желто-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела против IgG антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию	1 флакон 15 мл
буфер для промывок (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50х).	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течение 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови обычной венопункцией, избегая гемолиза.
2. Дайте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Избегайте тестирования гемолизных или липемичных образцов, хотя ни гемолиз, ни липемия не влияют на результаты анализа.
4. Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней и при -20 °С до 6 месяцев.
5. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Это может привести к различным потерям активности аутиантител.
6. Не рекомендуется тестировать образцы, инактивированные нагреванием.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °С) перед тестированием.

В начале анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией. Используйте свежие разведения образцов. Тестируйте все реагенты и образцы на дно лунок. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Готовый буфер для образцов храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление промывочного буфера
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Готовый промывочный буфер храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Подготовка образцов
- Разведите все образцы в 100 раз буфером для образцов перед тестированием. Например, внесите 10 мкл образца в 990 мкл буфера для образцов, в полистироловой пробирке. Тщательно перемешайте.
- Контроли уже готовы к использованию, их не требуется разводить!

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях.

	1	2	3	4	5	6
a	CA	CE	P1	P5		
b	CA	CE	P1	P5		
c	CB	CF	P2	P..		
d	CB	CF	P2	P..		
e	CC	K1	P3			
f	CC	K1	P3			
g	CD	K2	P4			
h	CD	K2	P4			

CA-CF: стандарты A - F

P1, P2...C: образцы 1, 2 ...

C1: положительный контроль

щательный контроль
 те по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разведенных
 в, в дублях, в соответствующие лунки.
 бируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
 лите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.
 авьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
 бируйте 15 минут при комнатной температуре.
 лите содержимое лунок и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.
 бавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку.
 кубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 бавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.
 считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.
 Рекомендуется бихроматическое считывание с длиной волны сравнения 600-690 нм.
 вившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
 тайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Метод ORGENTEC Anti-Gliadin IgG ELISA может быть выполнен с помощью открытого автоматического ИФА анализатора. Процедура метода, описанная выше, пригодна как для автоматического, так и для ручного выполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Анализ данных методом может считаться достоверным только в случае, если оптическая плотность положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандартов А – F, измеренная при длине волны 450 нм, попадает в диапазон допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе! Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты считаются не достоверными и тест должен быть выполнен еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах. Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgG к глиадину. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (СТ)

№	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср. оп. ед-нее	Кон. ц. 1	Кон. ц. 2	Ср. оп. ед-нее	Заяв. л. Кон	С V %
СТ А	А	0,0	0,00	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	28
А	1/В	06	9	08					
	1								

	0,1	0,17	0,1	6,0	5,9	5,9	6,0	2
	80	6	78					
	0,3	0,37	0,3	12	12	12	12	1
F1	67	4	71					
	0,7	0,72	0,7	25	25	25	25	1
H	13	4	18					
A	1,2	1,20	1,2	52	49	50	50	3
2/B	45	0	23					
2								
C	1,7	1,73	1,7	103	97	100	100	2
2/D	77	7	57					
2								

Интерпретация результатов

В исследовании нормального диапазона значений антител к глиадину с использованием данного набора у здоровых доноров получены следующие значения:

антитела к глиадину	
	IgG [Ед/мл]
нормальный уровень	< 12
повышенны й уровень	≥ 12

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сыывороточных антител к глиадину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к глиадину класса IgG были разведены буфером для образцов и проанализированы. Результаты были линейными во всем диапазоне измерения.

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к глиадину класса IgG составляет 0.5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт очищенным глиадином, выделенным из пшеницы. Данный набор предназначен для анализа только антител к глиадину.

Калибровка

Данный метод прокалиброван по сыворотке, международно признанной в качестве референсной, так как не существует другого международного стандарта.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный Метод Anti-Gliadin IgA ELISA может быть использован в диагностических целях. Конечный клинический диагноз не должен основываться только на результатах отдельного теста, но должен быть поставлен врачом на основании всех клинических и лабораторных исследований.

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), желтухой (до 3 г/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Также не было обнаружено помех при использовании различных антикоагулянтов.

МА ИНКУБАЦИИ

Добавить 100 μ л контролей
или проб пациента

☐

далить содержимое ячеек и трижды промыть 300 мкл промывочного раствора

Добавить 100 мкл раствора ферментного конъюгата	
---	--

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л
раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 мл стоп-раствора

Выдержать 5 минут

Считать при 450 нм

**Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»**

« » 2011г.

Подпись В.И.И.
удостоверяю:
Специалист по кадрам

Подпись

64 66

20



Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

18



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgA и IgG-антител к глиадину Anti-Gliadin Screen*

96 тестов

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Gliadin Screen предназначен для количественного определения IgG и IgA антител к глиадину в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА). Набор предназначен только для диагностики in vitro с целью диагностики целиакии.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Целиакия впервые была описана в 1888 году Dr. Samuel Gee, отметившим плохой рост, диарею, мальабсорбцию стула и вздутие живота как общие симптомы у детей. В 1950-х годах, когда появилась возможность проведения пероральной биопсии слизистой, у пациентов с целиакией было выявлено типичное нарушение слизистой тонкого кишечника. У пациентов, страдающих этим заболеванием, развивается атрофия ворсинок кишечника и гиперплазия крипт верхнего отдела тонкого кишечника [1].

Пациенты с целиакией могут страдать от диареи, различных желудочно-кишечных заболеваний, анемии, хронической усталости, психических проблем, или заболевание может протекать бессимптомно. Исчезновение клинических симптомов и восстановление слизистой после установления безглютеновой диеты является объективным показателем глютен-индуцированной энтеропатии. [2].

Диагноз целиакии устанавливается при выявлении патологии в тонком кишечнике, при исследовании биоптата, а затем подтверждается клиническим ответом на безглютеновую диету, т.е. исключение всех продуктов, содержащих пшеницу, рожь, овес и ячмень. Приблизительно для 10% пациентов, особенно взрослых, необходима, дополнительно к безглютеновой диете, терапия кортикостероидами, для нормализации слизистой кишечника. У пациентов, страдающих целиакией, не получивших соответствующего лечения, повышен риск развития лимфом или опухолей ЖКТ. Кроме того, целиакия, даже протекающая бессимптомно, без соответствующего лечения вызывает предрасположенность к другим аутоиммунным заболеваниям, таким как сахарный диабет, ревматоидные заболевания, аутоиммунный гепатит или тиреоидит.

Частая ассоциация целиакии и селективного дефицита IgA является потенциальным источником ложно отрицательных результатов при исследовании IgA. Таким образом, при подозрении на целиакию рекомендуется определение аутоантител класса IgG.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным глиадином из пшеницы. В ходе анализа происходит связывание аутоантител к этому антигену, присутствующих в разведенном образце сыворотки или плазмы, с антигеном. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. При последующей инкубации с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) с антителами к человеческим IgG и IgA образуется комплекс конъюгат/антитела, присутствующие в образце/антиген. При промывке удаляется несвязавшийся конъюгат. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизует с образованием голубого окрашивания. Добавление кислого стоп-раствора останавливает

реакцию, при этом окрашивание меняется на желтое. Интенсивность получившегося желтого окрашивания, измеряемая фотометрически при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgG и IgA антител, присутствующих в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых глиадином	1
Комбинированные калибраторы с IgG и IgA антителами к глиадину (A-F) в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к глиадину в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный (1) и отрицательный (2)), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи IgG-антитела против IgG и IgA антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл

Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию	1 флакон 15 мл
Буфер для промывок (PBS, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)), концентрат (50х).	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвержайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течений 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови обычной венопункцией, избегая гемолиза.
2. Дайте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Избегайте тестирования гемолизных или липемичных образцов, хотя ни гемолиз, ни липемия не влияют на результаты анализа.
4. Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней и при -20 °С до 6 месяцев.
5. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Это может привести к различным потерям активности аутиантител.
6. Не рекомендуется тестировать образцы, инактивированные нагреванием.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °С) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микроплшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.

10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
12. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Готовый буфер для образцов храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление промывочного буфера
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Готовый промывочный буфер храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Подготовка образцов
- Разведите все образцы в 100 раз буфером для образцов перед тестированием. Например, внесите 10 мкл образца в 990 мкл буфера для образцов, в полистироловой пробирке. Тщательно перемешайте.
- Контроли уже готовы к использованию, их не требуется разводить!

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

- Материал образца: сыворотка или плазма
- Объем образца: 10 μ л
- Образцы должны быть разбавлены 1:100 буфером для образцов.
- 100 μ л разбавленного образца для одинарного определения
- Общее время инкубации: 60 мин. при комнатной температуре (20 - 28 °C)
- Диапазон калибровки: 6 - 100 Е/мл
- Чувствительность: 0,5 Е/мл
- Хранение: охлаждение при 2 - 8 °C
- Срок годности: 12 месяцев с момента изготовления или до указанного на этикетках срока годности.
- Формат набора: 96 тестов

Планшет может быть разделен на 12 стрипов по 8 ячеек каждый или может быть использован сразу для 96 определений.

образование сэндвичевого комплекса и ферментная цветная реакция в следующих фазах реакции:

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях.

	1	2	3	4	5	6
a	CA	CE	P1	P5		
b	CA	CE	P1	P5		
c	CB	CF	P2	P..		
d	CB	CF	P2	P..		

e	CC	K1	P3			
f	CC	K1	P3			
g	CD	K2	P4			
h	CD	K2	P4			

CA-CF: стандарты А - F

P1, P2...C: образцы 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

2. Внесите по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разведенных образцов, в дублиях, в соответствующие лунки.

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).

4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.

5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.

6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

7. Удалите содержимое лунок и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.

8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку.

9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.

11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с длиной волны сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Метод ORGENTEC Anti-Gliadin IgG ELISA может быть выполнен с помощью открытого автоматического ИФА анализатора. Процедура метода, описанная выше, пригодна как для автоматического, так и для ручного выполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Анализ данных методом может считаться достоверным только в случае, если оптическая плотность положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандартов А - F, измеренная при длине волны 450 нм, попадает в диапазон допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе! Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты считаются не достоверными и тест должен быть выполнен еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и сглаженной аппроксимации сплайнами.
- Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах
- Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублиях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgG к глиадину. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (СТ)									
No	Лун ка	ОП 1	ОП 2	Ср ед- нее	Кон ц. 1	Кон ц. 2	Ср ед- нее	Заяв л. Кон	CV %
СТ A	A	0,0	0,02	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	14,
A	1/B	17	1	19					9
1									
СТ C	C	0,2	0,21	0,2	5,9	6,1	6,0	6,3	1,7
B	1/D	05	0	07					
1									
СТ E	E	0,4	0,44	0,4	12,3	12,8	12,	12,5	2,8
C	1/F	25	2	33			6		
СТ G	G	0,8	0,85	0,8	24,5	25,5	25	25	2,4
D	1/H	26	5	40					
1									
СТ A	A	1,5	1,53	1,5	49,6	50,9	50,	50	1,4
E	2/B	08	8	23			2		
2									
СТ C	C	2,4	2,35	2,4	104,	95,4	99,	100	3,5
F	2/D	70	0	10	3		9		
2									

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений антител к глиадину с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к глиадину IgG [Ед/мл]
нормальный уровень	<15
повышенный уровень	≥15

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к глиадину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями IgG-антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы.

Образец №	Разведение	Наблюдаемое [Ед/мл]	Ожидаемое [Ед/мл]	Соотношение Наблюдаемое/ Ожидаемое
1	1:200	17,6		
	1:400	8,9	8,9	100 %
	1:800	4,5	4,5	100 %
	1:1600	2,4	2,3	96 %

2	1:200	66,7		
	1:400	37,8	33,4	88 %
	1:800	19,5	18,9	97 %
	1:1600	8,7	9,8	97 %

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 6 различных опытов по 8 определений каждого образца:

Анти-аннексин V		
Внутри серии		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	13,4	2,2
2	29,2	5,1
3	68,8	3,7

Анти-аннексин V		
Между сериями		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	14,0	2,1
2	29,2	1,9
3	64,4	6,0

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к глиадину – 1,0 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт очищенным глиадином пшеницы. Данный набор специфичен только для аутоантител к глиадину.

Калибровка

До тех пор, пока не появится международный референс-стандарт для антител к глиадину, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Набор следует использовать как дополнительный диагностический метод, но он не должен использоваться как основной и единственный. Диагностика не может основываться на результате единственного теста, такой результат должен оцениваться клиницистами только в совокупности с информацией, полученной от других клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Также не было обнаружено влияния использования различных антикоагулянтов. Однако, из практических соображений рекомендуется избегать использования сильно гемолизных или липемичных образцов.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,
 ЗАО "БиоХимМак"
 тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
 факс (095) 939-09-97
 E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

IgG -антитела к глиадину

Добавить 100 μ л
стандартов в микроячейки

Добавить 100 μ л контролей
или проб пациента

☐ ☐
Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

☐
Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

☐
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

☐
Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л
раствора субстрата ТМБ

☐
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л
стоп-раствора

☐
Выдержать 5 минут

☐
Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к фосфатидил-серину классов IgG и IgM (Anti-Phosphatidyl Serine IgG/IgM).

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Phosphatidyl Serine предназначен для количественного определения IgG и антител к фосфатидил-серину в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro* с целью диагностики повышенного риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (SLE) или волчаночно-подобными заболеваниями.

ИСТОРИЯ

Исследование антител к фосфолипидам началось в 1906 году с введением Вассерманом серологического теста на сифилис. В 1942 году обнаружена фосфолипидная природа реактивного компонента, названного кардиолипином. К 1950 году выяснилось, что многие люди обнаруживали положительный тест на сифилис без клинических проявлений заболевания. Данное явление было названо биологическим ложноположительным серологическим тестом на сифилис. В группе таких пациентов была обнаружена высокая частота аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку и синдром Шегрена.

Наличие циркулирующего антикоагулянта у пациентов с системной красной волчанкой было впервые обнаружено в 1952 году и ассоциировано с повышенным риском пародоксального тромбоза в 1963 году. Термин "волчаночный антикоагулянт", введенный в 1972 году, не вполне корректен, так как данное вещество чаще обнаруживается у пациентов без волчанки и ассоциировано более с тромбозом, чем с патологическим кровотечением.

В последнее время выяснено, что кофактором связывания антифосфолипидных антител является $\beta 2$ -гликопротеин I. $\beta 2$ -гликопротеин I (аполипопротеин H) представляет собой $\beta 2$ -глобулин с молекулярной массой 50 килодальтон, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. Обнаружено, что $\beta 2$ -гликопротеин I ингибирует внутренний путь образования тромбина, участвуя тем самым в регуляции свертывания крови. $\beta 2$ -гликопротеин I *in vivo* ассоциирован с отрицательно заряженными веществами - анионными фосфолипидами, гепарином и липопротеинами. Участок связывания фосфолипидов находится в пятом домене молекулы.

Термином "антитела к фосфолипидам" обозначаются антитела к отрицательно заряженным соединениям, таким как кардиолипин, волчаночный антикоагулянт, фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота. Из этих соединений кардиолипин наиболее часто используется в качестве антигена в ИФА-тестах на антитела к фосфолипидам. Некоторые антисыворотки, реагирующие с ИФА-ячейками, покрытыми кардиолипином, могут реагировать с другими отрицательно заряженными фосфолипидами, такими как фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота.

Некоторые исследователи полагают, что использование фосфатидил-серина вместо кардиолипина в ИФА-тестах увеличивает специфичность диагностики. Однако при исследовании сывороток пациентов с предполагаемым антифосфолипидным синдромом представляется более целесообразным совместное использование обоих этих антигенов для повышения чувствительности метода у больных антифосфолипидным синдромом.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Ячейки микропланшета покрыты высокоочищенным человеческим фосфатидил-серином и высокоочищенным человеческим β 2-гликопротеином I. Присутствующие в разведенной сыворотке антитела к этим антигенам связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. При промывке удаляются все не связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке.

Антитела к IgG и IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, иммунологически связываются со связавшимися в лунках антителами из сывороток пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке. В присутствии связанного конъюгата ферментный субстрат гидролизуется с образованием голубого окрашивания.

Развитие окраски останавливается добавлением кислоты, при этом раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG и IgM антител, присутствующих в образце.

ПРИМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не пипетируйте ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным человеческим фосфатидил-серином и насыщенным высокоочищенным человеческим β 2-гликопротеином I. Готов к использованию.	1

Калиброванные калибраторы с антителами классов IgG и IgM к фосфолипидам в сывоточно/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), содержащие: 6 флаконов Концентрации: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 GPL Ед/мл и 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 MPL Ед/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к фосфолипидам в сывоточно/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5х).	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), светло-красный, содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена	1 флакон 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG-IgM антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50х).	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течении 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови обычной венопункцией, избегая гемолиза.
2. Дайте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.

тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Избегайте тестирования гемолизных или липемических образцов, хотя ни гемолиз, ни липемия не влияют на результаты анализа. Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней и при -20 °C до 6 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Это может привести к различным потерям активности аутиантител. Не рекомендуется тестировать образцы, инактивированные нагреванием.

ПРИМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- 1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
- 2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
- 3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.
- 4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
- 5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
- 6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
- 7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
- 8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
- 9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
- 10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
- 11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
- 12. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Готовый буфер для образцов храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Приготовление промывочного буфера
- Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Готовый промывочный буфер храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Подготовка образцов
- Разведите все образцы в 100 раз буфером для образцов перед тестированием. Например, внесите 10 мкл образца в 990 мкл буфера для образцов, в полистироловой пробирке. Тщательно перемешайте.

Контроли уже готовы к использованию, их не требуется разводить!

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях.

	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			

F: стандарты А - F

2....: образцы 1, 2 ...

положительный контроль

отрицательный контроль

Внесите по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разведенных образцов, в дублиях, в соответствующие лунки.

Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).

Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.

Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

Удалите содержимое лунок и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку.

Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.

11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с длиной волны сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Метод ORGENTEC Anti-Phosphatidyl Serine IgG/IgM ELISA может быть выполнен с помощью открытого автоматического ИФА анализатора. Процедура метода, описанная выше, пригодна как для автоматического, так и для ручного выполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Анализ данным методом может считаться достоверным только в случае, если оптическая плотность положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандартов А – F, измеренная при длине волны 450 нм, попадает в диапазон допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе! Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты считаются не достоверными и тест должен быть выполнен еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах. Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублиях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении анти-фосфолипидных антител класса IgG и IgM. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

карты									
N	Лунк	ОП	ОП	Сре	Ко	Кон	Сре	Зая	CV
о	а	1	2	д- нее	нц. 1	ц. 2	д- нее	вл Ко нц.	%
ST	A 1/B	0.08	0.09	0.08	0.0	0.3	0.2	0.0	5
A	1	5	1	8					
ST	C 1/D	0.27	0.22	0.22	6.0	5.8	5.9	6.3	2
B	1	7	2	5					
ST	E 1/F	0.37	0.37	0.37	12.	12.	12.2	12.	1
C	1	0	6	3	0	3		5	
ST	G 1/H	0.68	0.70	0.69	26	27	27	25	2
D	1	7	3	5					
ST	A 2/B	1.10	1.11	1.11	48	48	48	50	0
E	2	9	3	1					
ST	C 2/D	1.91	1.88	1.89	102	100	101	100	1
F	2	1	1	6					
ST	A 7/B	0.03	0.03	0.03	0.0	0.1	0.0	0.0	4
A	7	1	3	2					
ST	C 7/D	0.23	0.24	0.24	6.1	6.3	6.2	6.3	3
B	7	9	9	4					
ST	E 7/F	0.45	0.46	0.46	12.	12.	12.6	12.	1
C	7	8	5	2	5	7		5	
ST	G 7/H	0.79	0.82	0.80	24	26	25	25	3
D	7	1	6	9					
ST	A 8/B	1.28	1.29	1.29	50	51	50	50	1
E	8	9	9	4					
ST	C 8/D	1.79	1.78	1.78	101	99	100	100	0
F	8	1	4	8					

Интерпретация результатов

При исследовании нормального диапазона значений анти-фосфолипидных антител с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

антитела к фосфатидилсерину		
	IgG [GPL Ед/мл]	IgM [MPL Ед/мл]
нормальный уровень	< 10	< 10
повышенны й уровень	≥ 10	≥ 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к фосфатидилсерину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт очищенным фосфатидилсеринем и насыщен человеческим β2-гликопротеином I. Специальный процесс нанесения, разработанный производителем, гарантирует сохранение нативной

огенной структуры фосфолипидов после иммобилизации на твердой фазе. Данный метод ИФА физическим выявляет антитела к соответствующим фосфолипидам или комплексам отрицательно заряженных фосфолипидов и β 2-гликопротеина I. Не наблюдалось перекрестной реактивности с анти-антителами и антителами, присутствующими при сифилисе.

КАЛИБРОВКА

Система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Irvine, CA, и IgG специфичный референсному материалу IRP 97/656 и NCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный Метод Anti-Phosphatidyl Serine IgG/IgM ELISA может быть использован в диагностических целях. Конечный клинический диагноз не должен основываться только на результатах отдельного теста, но должен быть поставлен врачом на основании всех клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 1000 мг/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Также не было обнаружено влияния использования различных антикоагулянтов. Однако, из практических соображений рекомендуется избегать использования сильно гемолизных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к фосфатидил-серину (IgG/IgM)

Добавить
100 μ л стандартов в
микроячейки

Контроли
100 μ л контролей или проб
пациента

- ☐ Инкубировать 30 минут при комнатной температуре
- ☐ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

- ☐ Инкубировать 15 минут при комнатной температуре
- ☐ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

- ☐ Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

- ☐ Выдержать 5 минут и Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.
2011г.

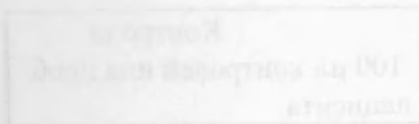
Всего прошито
и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Гамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения IgG и IgM антител к фосфатидилинозитолу Anti-Phosphatidyl Inositol IgG/IgM.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Phosphatidyl Inositol предназначен для количественного определения IgM антител к фосфатидилинозитолу в человеческой сыворотке или плазме методом ферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики in vitro с диагностики повышенного риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (SLE) и аналогично-подобными заболеваниями.

ИСТОРИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Первое исследование анти-фосфолипидных антител было начато в 1906, когда Wasserman изобрел серологический тест на сифилис. В 1942, было показано, что активным компонентом является фосфолипид, который был назван кардиолипином. В 1950х годах стало понятно, что у большого количества людей результаты теста на сифилис положительные, но без каких-либо данных о наличии заболевания. Этот феномен отнесли к биологическому ложноположительному результату на серологический тест для выявления сифилиса. Была показана высокая встречаемость аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку (SLE) и синдром Шегрена в этой группе пациентов. Присутствие циркулирующих антикоагулянтов у больных с SLE впервые было показано в 1952, а в 1963 было ассоциировано с повышенным риском парадоксального тромбоза.

Термин волчаночный антикоагулянт (LA), впервые использованный в 1972, абсолютно неправильный, так как LA гораздо чаще встречается у пациентов, не страдающих волчанкой, и ассоциирован с тромбозом а не с аномальным кровотечением.

За последнее время стало ясно, что оптимальное связывание анти-фосфолипидный антител зависит от ко-фактора, называемого β 2-гликопротеин I (аполипоротин H, β 2GPI). β 2GPI – это 50 кДа β 2-глобулин, присутствующий в плазме в концентрации около 200 мкг/мл. Было показано, что β 2-гликопротеин I ингибирует нормальный путь коагуляции и, таким образом, участвует в регуляции коагуляции крови. in vivo β 2GPI ассоциирован с отрицательно заряженными веществами, такими как анионные фосфолипиды, гепарин и липопротеины. Фосфолипид-связывающая область расположена в его пятом домене.

Под акронимом "aPL" (анти-фосфолипидные антитела) принято подразумевать антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам, таким как CL (кардиолипин), LA (волчаночный антикоагулянт), PS (фосфатидилсерин), PI (фосфатидилинозитол) и PA (фосфатидиловая кислота). Среди них кардиолипин является фосфолипидом, наиболее часто используемым в качестве антигена для выявления aPL методом ELISA. Некоторые антисыворотки, которые связываются с микропланшетами, покрытыми кардиолипином, могут также связываться с микропланшетами. Покрытыми и другими отрицательно заряженными фосфолипидами, таким как фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол и фосфатидиловая кислота (PA).

Некоторые ученые предположили, что использование PS вместо кардиолипина в ELISA может дать возможность более специфичной диагностики. Эти антигены не так часто используются и дополнительное их использование может повысить клиническую чувствительность теста у пациентов

подозрении на APS (анти-фосфолипидный синдром), но они не могут замнить измерение антител к кардиолипину.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета, насыщенные $\beta 2$ -гликопротеином I, покрыты высокоочищенным фосфатидилинозитолом. В ходе анализа происходят связывание аутоантител к этим антигенам, присутствующих в разведенном образце сыворотки или плазмы, с соответствующим антигеном. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. При последующей инкубации с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) с антителами к человеческим IgG и IgM образуется комплекс конъюгат/антитела, присутствующие в образце/антиген. При промывке удаляется несвязавшийся конъюгат. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания.

Добавление кислого стоп-раствора останавливает реакцию, при этом окрашивание меняется на желтое. Интенсивность получившегося желтого окрашивания, измеряемая фотометрически при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgG и IgM антител, присутствующих в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным фосфатидилинозитолом и насыщенным $\beta 2$ -гликопротеином I.	1

нированные калибраторы с IgG и IgM анти-фосфолипидными антителами (A-F) в точном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 0; 6.3; 25; 50 и 100 GPL Ед/мл, 0; 6.3; 25; 50 и 100 MPL Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
роли анти-фосфолипидных антител в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный (1) и отрицательный (2)), концентрации аны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
ер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл
створ ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), держаний поликлональные кроличьи антитела против IgG антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
створ ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), держаний поликлональные кроличьи антитела против IgM антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию	1 флакон 15 мл
Буфер для промывок (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течений 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови обычной венопункцией, избегая гемолиза.
2. Дайте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Избегайте тестирования гемолизных или липемичных образцов, хотя ни гемолиз, ни липемия не влияют на результаты анализа.
4. Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней и при -20 °С до 6 месяцев.
5. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Это может привести к различным потерям активности аутиантител.

рекомендуется тестировать образцы, инаktivированные нагреванием.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Используйте компоненты набора после истечения срока годности.
- Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
- Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.
- Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
- Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
- Всегда используйте свежие разведения образцов.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
- Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
- Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
- Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
- Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
- Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Готовый буфер для образцов храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного буфера

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Готовый промывочный буфер храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Подготовка образцов

Разведите все образцы в 100 раз буфером для образцов перед тестированием. Например, внесите 10 мкл образца в 990 мкл буфера для образцов, в полистироловой пробирке. Тщательно перемешайте.

Контроли уже готовы к использованию, их не требуется разводить!

МЕТОДИКА

- Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях.

	1	2	3	4	5	6
a	CA	CE	P1	P5		
b	CA	CE	P1	P5		
c	CB	CF	P2	P..		
d	CB	CF	P2	P..		
e	CC	K1	P3			
f	CC	K1	P3			

g	CD	K2	P4			
h	CD	K2	P4			

F: стандарты А - F

2...: образцы 1, 2 ...

положительный контроль

отрицательный контроль

Внесите по **100 мкл** соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разведенных разцов, в дублиях, в соответствующие лунки.

Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре (20 - 28 °C).

Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте **300 мкл** промывочного буфера.

Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.

Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.

Удалите содержимое лунок и **трижды** промойте **300 мкл** промывочного буфера.

Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую лунку.

Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.

0. Добавьте **100 мкл** стоп-раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.

1. Считайте оптическую плотность при **450 нм** и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с длиной волны сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Метод ORGENTEC Anti-Phosphatidyl Inositol IgG/IgM ELISA может быть выполнен с помощью открытого автоматического ИФА анализатора. Процедура метода, описанная выше, пригодна как для автоматического, так и для ручного выполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Анализ данных методом может считаться достоверным только в случае, если оптическая плотность положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандартов А – F, измеренная при длине волны 450 нм, попадает в диапазон допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе! Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты считаются не достоверными и тест должен быть выполнен еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублиях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении анти-фосфолипидных антител класса IgG и IgM. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты

	Лунк а	ОП 1	ОП 2	Сре д- нее	Ко нц. 1	Конц. 2	Сре д- нее	аяв. Конц	CV %
ST A 1	A 1/B 1	0.085	0.091	0.088	0.0	0.3	0.2	0.0	5
ST B 1	C 1/D 1	0.277	0.222	0.225	6.0	5.8	5.9	6.3	2
ST C 1	E 1/F 1	0.370	0.376	0.373	12.0	12.3	12.2	12.5	1
ST D 1	G 1/H 1	0.687	0.703	0.695	26	27	27	25	2
ST E 2	A 2/B 2	1.109	1.113	1.111	48	48	48	50	0
ST F 2	C 2/D 2	1.911	1.881	1.896	102	100	101	100	1
ST A 7	A 7/B 1	0.031	0.033	0.032	0.0	0.1	0.0	0.0	4
ST B 7	C 7/D 9	0.239	0.249	0.244	6.1	6.3	6.2	6.3	3
ST C 7	E 7/F 8	0.458	0.465	0.462	12.5	12.7	12.6	12.5	1
ST D 7	G 7/H 1	0.791	0.826	0.809	24	26	25	25	3
ST E 8	A 8/B 9	1.289	1.299	1.294	50	51	50	50	1
ST F 8	C 8/D 1	1.791	1.784	1.788	101	99	100	100	0

Интерпретация результатов

При исследовании нормального диапазона значений анти-фосфолипидных антител с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

антитела к фосфатидилинозитолу		
	IgG [GPL Ед/мл]	IgM [MPL Ед/мл]
нормальный уровень	< 10	< 10
повышенны й уровень	≥ 10	≥ 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к фосфатидилинозитолу.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт очищенным фосфатидилинозитолом и насыщен человеческим β2-гликопротеином I.

альный процесс нанесения, разработанный производителем, гарантирует сохранение нативной конформации структуры фосфолипидов после иммобилизации на твердой фазе. Данный метод ИФА физическим выявляет антитела к соответствующим фосфолипидам или комплексам отрицательно заряженных фосфолипидов и β 2-гликопротеина I. Не наблюдалось перекрестной реактивности с анти-антителами и антителами, присутствующими при сифилисе.

КАЛИБРОВКА

Система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Irvine, США, и IgG специфичный референсному материалу IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный Метод Anti-Phosphatidyl Inositol IgG/IgM ELISA может быть использован в диагностических целях. Конечный клинический диагноз не должен основываться только на результатах отдельного теста, но должен быть поставлен врачом на основании всех клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 1000 мг/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Также не было обнаружено влияния использования различных антикоагулянтов.

Однако, из практических соображений рекомендуется избегать использования сильно гемолизных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

1. Добавьте в ячейки по **100 мкл** стандартов, контролей и образцов



Инкубируйте **30 мин.** при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и **трижды промойте**, используя по **300 мкл** буфера для промывок на лунку

2. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата



Инкубируйте **15 мин.** при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и **трижды промойте**, используя по **300 мкл** буфера для промывок на лунку

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ



Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора



Выдержите 5 минут



Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»
В.В.



Д.М.Н., профессор Долгов

« ____ » _____ 2011г.

Всего прошито
и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения IgG и IgM антител к фосфатидиловой кислоте Anti-Phosphatidic Acid IgG/IgM.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Phosphatidic Acid предназначен для количественного определения IgG и IgM антител к фосфатидиловой кислоте в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro* с целью диагностики повышенного риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (SLE) или волчаночно-бными заболеваниями.

ИСТОРИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Первое исследование анти-фосфолипидных антител было начато в 1906, когда Wasserman описал серологический тест на сифилис. В 1942, было показано, что активным компонентом является фосфолипид, который был назван кардиолипином. В 1950х годах стало понятно, что у большого количества людей результаты теста на сифилис положительные, но без каких-либо данных о наличии заболевания. Этот феномен отнесли к биологическому ложноположительному результату на серологический тест для выявления сифилиса. Была показана высокая встречаемость аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку (SLE) и синдром Шегрена в этой группе пациентов.

Присутствие циркулирующих антикоагулянтов у больных с SLE впервые было показано в 1952, а в 1963 было ассоциировано с повышенным риском парадоксального тромбоза.

Термин волчаночный антикоагулянт (LA), впервые использованный в 1972, абсолютно неправильный, так как LA гораздо чаще встречается у пациентов, не страдающих волчанкой, и ассоциирован с тромбозом а не с аномальным кровотечением.

За последнее время стало ясно, что оптимальное связывание анти-фосфолипидный антител зависит от ко-фактора, называемого $\beta 2$ -гликопротеин I (аполипоротин H, $\beta 2$ GPI). $\beta 2$ GPI – это 50 кДа $\beta 2$ -глобулин, присутствующий в плазме в концентрации около 200 мкг/мл. Было показано, что $\beta 2$ -гликопротеин I ингибирует нормальный путь коагуляции и, таким образом, участвует в регуляции коагуляции крови. *in vivo* $\beta 2$ GPI ассоциирован с отрицательно заряженными веществами, такими как анионные фосфолипиды, гепарин и липопротеины. Фосфолипид-связывающая область расположена в его пятом домене.

Под акронимом "aPL" (анти-фосфолипидные антитела) принято подразумевать антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам, таким как CL (кардиолипин), LA (волчаночный антикоагулянт), PS (фосфатидилсерин), PI (фосфатидилинозитол) и PA (фосфатидиловая кислота). Среди них кардиолипин является фосфолипидом, наиболее часто используемым в качестве антигена для выявления aPL методом ELISA. Некоторые антисыворотки, которые связываются с микропланшетами, покрытыми кардиолипином, могут также связываться с микропланшетами. Покрытыми и другими отрицательно заряженными фосфолипидами, таким как фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол и фосфатидиловая кислота (PA).

Некоторые ученые предположили, что использование PS вместо кардиолипина в ELISA может дать возможность более специфичной диагностики. Эти антигены не так часто используются и дополнительное их использование может повысить клиническую чувствительность теста у пациентов

подозрении на APS (анти-фосфолипидный синдром), но они не могут замнить измерение антител к кардиолипину.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета, насыщенные β 2-гликопротеином I, покрыты высокоочищенной фосфатидиловой кислотой. В ходе анализа происходят связывание аутоантител к этим антигенам, присутствующих в разведенном образце сыворотки или плазмы, с соответствующим антигеном. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. При последующей инкубации с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) с антителами к человеческому IgG и IgM образуется комплекс конъюгат/антитела, присутствующие в образце/антиген. При промывке удаляется несвязавшийся конъюгат. В присутствии связавшегося конъюгата ферментный субстрат гидролизуетс с образованием глубокого окрашивания.

Добавление кислого стоп-раствора останавливает реакцию, при этом окрашивание меняется на желтое. Интенсивность получившегося желтого окрашивания, измеряемая фотометрически при длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IgG и IgM антител, присутствующих в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенной фосфатидиловой кислотой и насыщенных β 2-гликопротеином I.	1

нированные калибраторы с IgG и IgM анти-фосфолипидными антителами (A-F) в точном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 0; 6.3; 25; 50 и 100 GPL Ед/мл, 0; 6.3; 25; 50 и 100 MPL Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
роли анти-фосфолипидных антител в сывороточном/буферном матриксе, (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный (1) и отрицательный (2)), концентрации указаны на этикетке к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл
раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела против IgG антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела против IgM антител человека, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию	1 флакон 15 мл
буфер для промывок (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течении 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови обычной венопункцией, избегая гемолиза.
2. Дайте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Избегайте тестирования гемолизных или липемичных образцов, хотя ни гемолиз, ни липемия не влияют на результаты анализа.
4. Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней и при -20 °С до 6 месяцев.
5. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Это может привести к различным потерям активности аутиантител.

рекомендуется тестировать образцы, инаktivированные нагреванием.

НАЧАЛЬНЫЕ ПО МЕТОДИКЕ

Используйте компоненты набора после истечения срока годности.

Заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.

Материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.

Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.

Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.

Всегда используйте свежие разведения образцов.

Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.

Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.

Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.

Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.

Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.

2. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл, перед использованием. Готовый буфер для образцов храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного буфера

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Готовый промывочный буфер храниться при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления, или до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Подготовка образцов

Разведите все образцы в 100 раз буфером для образцов перед тестированием. Например, внесите 10 мкл образца в 990 мкл буфера для образцов, в полистироловой пробирке. Тщательно перемешайте.

Контроли уже готовы к использованию, их не требуется разводить!

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов, в дублях.

	1	2	3	4	5	6
a	CA	CE	P1	P5		
b	CA	CE	P1	P5		
c	CB	CF	P2	P..		
d	CB	CF	P2	P..		
e	CC	K1	P3			
f	CC	K1	P3			

g	CD	K2	P4			
h	CD	K2	P4			

стандарты А - F

образцы 1, 2 ...

положительный контроль

отрицательный контроль

внесите по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разведенных образцов, в дублиях, в соответствующие лунки.

инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).

удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.

добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.

инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

удалите содержимое лунок и трижды промойте 300 мкл промывочного буфера.

добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку.

инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.

считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с длиной волны сравнения 600-690 нм.

Получившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Метод ORGENTEC Anti-Phosphatidic Acid IgG/IgM ELISA может быть выполнен с помощью открытого автоматического ИФА анализатора. Процедура метода, описанная выше, пригодна как для автоматического, так и для ручного выполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Анализ данным методом может считаться достоверным только в случае, если оптическая плотность положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандартов А - F, измеренная при длине волны 450 нм, попадает в диапазон допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества, поставляемом в наборе! Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты считаются не достоверными и тест должен быть выполнен еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах. Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублиях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении анти-фосфолипидных антител класса IgG и IgM. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты

Лунк а	ОП 1	ОП 2	Сре д- нее	Ко нц. 1	Кон ц. 2	Сре д- нее	Зая вл Ко нц.	CV %
ST A 1/B 1	0.085	0.091	0.088	0.0	0.3	0.2	0.0	5
ST C 1/D 1	0.277	0.222	0.225	6.0	5.8	5.9	6.3	2
ST E 1/F 1	0.370	0.376	0.373	12.0	12.3	12.2	12.5	1
ST G 1/H 1	0.687	0.703	0.695	26	27	27	25	2
ST A 2/B 2	1.109	1.113	1.111	48	48	48	50	0
ST C 2/D 2	1.911	1.881	1.896	102	100	101	100	1
ST A 7/B 7	0.031	0.033	0.032	0.0	0.1	0.0	0.0	4
ST C 7/D 7	0.239	0.249	0.244	6.1	6.3	6.2	6.3	3
ST E 7/F 7	0.458	0.465	0.462	12.5	12.7	12.6	12.5	1
ST G 7/H 7	0.791	0.826	0.809	24	26	25	25	3
ST A 8/B 8	1.289	1.299	1.294	50	51	50	50	1
ST C 8/D 8	1.791	1.784	1.788	101	99	100	100	0

Интерпретация результатов

При исследовании нормального диапазона значений анти-фосфолипидных антител с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

антитела к фосфатидиловой кислоте		
	IgG [GPL Ед/мл]	IgM [MPL Ед/мл]
нормальный уровень	< 10	< 10
повышенный уровень	≥ 10	≥ 10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуются каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к фосфатидиловой кислоте.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт очищенной фосфатидиловой кислотой и насыщен человеческим β 2-гликопротеином I.

альный процесс нанесения, разработанный производителем, гарантирует сохранение нативной конформации фосфолипидов после иммобилизации на твердой фазе. Данный метод ИФА физическим выявляет антитела к соответствующим фосфолипидам или комплексам отрицательно заряженных фосфолипидов и β 2-гликопротеина I. Не наблюдалось перекрестной реактивности с анти-антителами и антителами, присутствующими при сифилисе.

КАЛИБРОВКА

Система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Irvine, США, и IgG специфичный референсному материалу IRP 97/656 и HCAL/EY2C9.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный Метод Anti-Phosphatidic Acid IgG/IgM ELISA может быть использован в диагностических целях. Конечный клинический диагноз не должен основываться только на результатах отдельного теста, но должен быть поставлен врачом на основании всех клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 100 мг/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Также не было обнаружено влияния использования различных антикоагулянтов.

Однако, из практических соображений рекомендуется избегать использования сильно гемолизных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов



Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата



Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ



Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора



Держите 5 минут



ируйте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

ав. Кафедрой клинической

лабораторной диагностики ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011г.

Подпись Давыдов В.Р.
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ " _____ 20 ____ года



Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для качественного определения антител к ядерным антигенам (ANA) ANA combi.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC ANAcombi предназначен разработан для качественного определения антиядерных аутоантител класса IgG к RNP-70, RNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, 70, центромере В и Jo-1. Набор предназначен только для диагностики in vitro и не должен использоваться для диагностики систематических ревматоидных заболеваний.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Серологическая детекция антиядерных антител (ANA) у пациентов с предполагаемыми аутоиммунными нарушениями - общая практика в каждой иммунологической лаборатории.

Воспалительные заболевания соединительной ткани характеризуются идиопатическим генезом, нарушениями клеточного и гуморального иммунитета, системной недостаточностью органов и хроническим течением болезни. Кроме того, на клиническую картину соединительнотканного заболевания накладываются индивидуальные симптомы, что усложняет постановку правильного диагноза.

Системную красную волчанку (СКВ), синдром Шегрена, прогрессирующую системную склеродермию наряду с CREST-синдромом, синдромом Шарпа (другое название - смешанное заболевание соединительной ткани) и миозитом относят к воспалительным ревматическим заболеваниям.

При рассмотрении различные нарушения характеризуются общими серологическими признаками: наличием антиядерных антител. Эти антитела направлены против структур цитоплазмы и ядра клетки. Присутствие специфических ANA в сыворотке пациентов коррелирует с тем или иным заболеванием из выше перечисленных.

При подозрении на аутоиммунные нарушения первым диагностическим тестом является скрининговый анализ на антинуклеарные антитела. Общепринята непрямая иммунофлюоресценция с использованием клеточной линии HEp-2. Второй этап ANA-алгоритма - определение специфичности обнаруженных антител (например, с ANA-combi, ORG 539). Между ними может быть выполнен дополнительный скрининговый анализ.

Лунки планшета набора ORGENTEC ANAcombi ELISA покрыты восемью аутоантигенами, позволяющими проводить определение наиболее важных антинуклеарных антител: анти-RNP-70 (также называемый анти-RNP-68), анти-Sm,

анти-RNP-Sm (он же анти-U1-snRNP), анти-SS-A, анти-SS-B, анти-Scl-70, анти-центромер В и анти-Jo-1. Таким образом, набор ANAcombi позволяет проводить чувствительное определение 8 различных аутоантител, которые могут присутствовать в сыворотке пациентов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В лунках планшета сорбированы очищенные антигены SS-A (Ro), SS-B (La), RNP-70, Sm, RNP/Sm, Centromer-B и Jo-1. В ходе анализа происходят: связывание присутствующих аутоантител. Промывочный раствор удаляет несвязавшиеся компоненты сыворотки. Раствор конъюгата анти-IgG человека-пероксидаза хрена связывается с аутоантителами пациента с формированием иммунного комплекса конъюгат-антитела. Несвязавшийся ферментный конъюгат удаляется промывочным раствором. Хромогенный раствор субстрата, содержащий ТМБ, в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислого стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность окраски измеряется при 450 нм.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора 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 крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для разбавления образцов и промывочный буферный раствор) содержат азид натрия в качестве консервантов. Азид натрия (NaN_3) высоко токсичное и активное в чистом виде вещество. В той концентрации, в которой он находится в компонентах набора, он не опасен. Несмотря на это производители набора настоятельно рекомендуют с осторожностью использовать набор (пп 7,8,9)
- Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При смыве в канализацию рекомендуется разбавлять отходы большим количеством воды для снижения активного уровня.
- Во время работы пользуйтесь одноразовыми перчатками и тщательно мойте руки после работы.
- Не отбирайте образцы ртом
- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить и пользоваться косметикой.

- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях для использования контролей и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови следуйте локальным юридическим руководствам.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенными антигенами RNP-70 (ряд A), RNP/Sm (ряд B), Sm (ряд C), SS-A (ряд D), SS-B (ряд E), Scl-70 (ряд F), центромера В (ряд G) и Jo-1 (ряд H), помещенный в пакет из фольги с осушителем. Готов для использования.	1
Контроли анти-АЯА антител в сывороточно/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$): отрицательный контроль (NC), контроль-калибратор (CC). Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), желтый, концентрат 5х	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, Проклин 300 $< 0,5\%(\text{v/v})$) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-IgG человека антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (фосфатно-солевой буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$, концентрат, 50х	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

- Хранить при 2 - 8 °C
- Ячейки микропланшета хранятся в пакете с осушителем
- Компоненты набора стабильны до срока годности, указанного на этикетках.
- Беречь реагенты от воздействия тепла, солнца и яркого света при хранении и использовании.
- Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °C

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер
- Лабораторный таймер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л
- Вортекс
- программное обеспечение для ридера

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Соберите образец цельной крови стандартной венопункцией, избегая гемолиза.
- Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием
- Избегайте гемолиза, липемии или микробиологического загрязнения сыворотки
- Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения до шести месяцев образцы следует заморозить при -20°C.
- Для предотвращения повторных циклов замораживания-оттаивания (это может привести к потере активности антител) следует приготовить аликвоты образцов.
- Все пробы сыворотки и плазмы должны быть разбавлены 1:100 буфером для образцов. Следовательно, 10 мкл образца могут быть разбавлены 1000 мкл буфера.
- Использование для анализа инактивированной нагреванием сыворотки не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ по выполнению анализа

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°C).
- Подготовьте все реагенты и образцы перед началом работы. Начав работать, выполняйте все шаги анализа без задержек для получения надежных и воспроизводимых результатов.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеразбавленные образцы.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Избегайте контаминации переносом образца в соседние ячейки – используйте одноразовые наконечники для каждого образца и реагента.
- Качественная промывка принципиальна для результата анализа, удаляйте оставшиеся капли полностью после промывки.
- Точно соблюдайте длительность инкубаций

- Контрольные образцы или пулированные сыворотки анализируйте как неизвестные для проверки работы реагентов и выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Используйте эти значения для построения калибровочной кривой, если хотите рассчитать результаты полуколичественно

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.
2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

Кол онка Ряд		1	2	3	4	5	CC- Калибрат ор, NC- отрицате льн.
RNP	A	C	N	P	P	P.	
-70		C	C	1	2	.	
RNP/	B	C	N	P	P	P.	
Sm		C	C	1	2	.	
Sm	C	C	N	P	P	P.	
		C	C	1	2	.	NC- отрицате льн.
SS-A	D	C	N	P	P	P.	
		C	C	1	2	.	
SS-B	E	C	N	P	P	P.	NC- отрицате льн.
		C	C	1	2	.	

Scl-70	F	C	N	P	P	P.
		C	C	1	2	.
Центромера В	G	C	N	P	P	P.
		C	C	1	2	.
Jo-1	H	C	N	P	P	P.
		C	C	1	2	.

3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (18-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.
- Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
Считайте оптическую плотность за это время.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчёт результатов по оптической плотности:

Оценка результатов теста ANAcomb1 проводится прямым сравнением отношения оптической плотности (ОП) образца каждого пациента с ОП cutt-off контроля конкретного антигена – расчётом индекса позитивности. Для каждого образца пациента значение индекса рассчитывается следующим образом:

$$\text{Индекс образца} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП Контроля Cut-off}}$$

Проба пациента положительна по одному параметру, если для этого параметра Индекс образца ≥ 1.2 , отрицательна - если Индекс образца < 1.0 .

Отрицательный:	Индекс образца	$< 1,0$
Пограничный:	Индекс образца	$1,0 - 1,2$
Положительный:	Индекс образца	$\geq 1,2$

Альтернативный расчёт:

Оценка результатов теста ANAcombi проводится сравнением отношения ОП образца каждого пациента с ОП cutt-off контроля - калибратора, причём сначала ОП калибратора каждого антигена корректируется по специфичному фактору (F) (специфичные факторы указаны в сертификате).

Для каждого из восьми антигенов значение ОП cutt-off рассчитывается по формуле:

$$\text{ОП cutt-off кор.} = \text{ОП калибратора} \times F$$

Проба пациента положительна по одному параметру, если для этого параметра ОП образца $\geq$ ОП cutt-off кор., отрицательна - если ОП образца $<$ ОП cutt-off кор.

Для детального количественного анализа рекомендуется использовать тесты фирмы «Orgentec» для определения отдельных антигенов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении ANA. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Образец №	Антиген	Ряд	ОП калибратора	Фактор F	ОП cutt-off кор.	ОП образца	Результат
1	RNP-70	A	0,48	1,10	0,53	0,083	отрицат
1	RNP/Sm	B	0,50	1,00	0,50	0,420	отрицат
1	Sm	C	0,40	1,25	0,50	0,138	отрицат
1	SS-A	D	0,42	0,85	0,36	0,133	отрицат
1	SS-B	E	0,53	0,75	0,39	0,505	положит
1	Scl-70	F	0,57	1,00	0,57	0,820	положит
1	Центромера В	G	0,49	0,80	0,39	0,212	отрицат
1	Jo-1	H	0,50	0,80	0,40	0,189	отрицат

Ожидаемые значения

В общей популяции частота положительных результатов 5%, 40% - у здоровых пожилых лиц, и 25% родственников больных СКВ. ANA-положительны у пациентов с:
 СКВ 95%

Синдром Шегрена	50-65%
Прогрессирующая системная склеродермия	40-60%
Ревматоидный артрит	12-24%
Ювенильный ревматоидный артрит	20%

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

A, SS-B, Scl-70, центромеры B и Jo-1, соответственно, очищенных методом аффинной хроматографии. Тест ANA combi специфичен только для аутоантител к этим антигенам. Перекрестных реакций не наблюдалось.

КАЛИБРОВКА

Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки: CDC, Атланта, США, так как других международных стандартов не существует.

Ограничения метода

Набор следует использовать как дополнительный диагностический метод, но он не должен использоваться как основной и единственный. Диагностика не может основываться на результате единственного теста, такой результат должен оцениваться клиницистами только в совокупности с информацией, полученной от других клинических и лабораторных исследований.

Из-за дополнительных эффектов каждого из восьми антигенов сыворотка, имеющая положительный результат с использованием набора ANAScreen, может определяться отрицательной в подтверждающих тестах.

Положительный результат может быть у здоровых лиц.

Больные СКВ, получающие стероидную терапию, могут иметь отрицательный результат анализа.

В целом, ряд применяемых лекарственных средств может индуцировать ANA.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз	до 1000 мг/дл
Липемия	до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин	до 40 мг/дл
Антикоагулянты	в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

ANAcombi

Добавить
100 μ л контролей в
микроячейки

100 μ л проб
пациента

☐

☐

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

☐

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

☐

Добавить 100 μ л раствора
ферментного конъюгата

☐

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

☐

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

☐

Добавить 100 μ л раствора субстрата
ТМБ

☐

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

☐

Добавить 100 μ л стоп-
раствора

☐

Оставить на 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ " ____ 20 ____ года



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Гамм Н.Е.

2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgA антител к тканевой трансглутаминазе Anti-Tissue Transglutaminase IgA*

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Впервые целиакия была описана Dr. Samuel Gee в 1888 году. Он отмечал недостаточный рост, патологический стул и вздутие живота как общие признаки болезни у детей. В 1950 годы, с появлением возможности проводить перорально биопсию слизистой, выявлены типичные аномалии слизистой кишки у пациентов с целиакией. У пациентов, страдающих этим заболеванием, наблюдается слизистая оболочка с резким укорочением ворсинок и гипертрофией крипт [1]. Больные целиакией могут страдать от диареи, различных желудочно-кишечных проблем, утомляемости, психиатрических расстройств, или заболевание может протекать бессимптомно. Клинические данные и исследование слизистой после установления безглютеновой диеты являются объективными признаками того, что энтеропатия индуцирована глютеном [2]. Диагностика целиакии основывается на обнаружении патологических изменений в тонком кишечнике при биопсии и позднее верифицируется с помощью безглютеновой диеты, то есть исключением из питания пшеницы, ячменя, ржи, овса и продуктов, содержащих их компоненты. Приблизительно 10% пациентов, особенно взрослых, для восстановления слизистой необходимы кортикостероиды в дополнение к исключению глютена из рациона. При отсутствии лечения у пациентов, страдающих целиакией, повышен риск развития лимфом или злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта.

Более того, даже при отсутствии клинических проявлений, нелеченая на протяжении длительного периода целиакия вызывает предрасположенность к другим аутоиммунным заболеваниям, таким как сахарный диабет, ревматоидные заболевания, аутоиммунный гепатит или тиреоидит.

Повышенная ассоциация целиакии с селективным IgA дефицитом является потенциальной причиной ложноотрицательных результатов анализа IgA. Таким образом, если предполагается целиакия, рекомендуется проводить тестирование аутоантител класса IgG.

Было показано, что фермент тканевая трансглутаминаза (tTG) является основной, если не единственной, мишенью для эндомизимальных антител. Уровень этих антител падает при соблюдении безглютеновой диеты, облегчая этим контроль соблюдения диеты. Анти-tTG IgA являются очень чувствительным маркером целиакии 95-100 % при специфичности 90-97 % [3, 4, 5, 6].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты рекомбинантной тканевой трансглутаминазой. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgA человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания.

Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется

ометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации и IgA антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие гепатита В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно мойте водой с мылом.

Б. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

Некоторые компоненты набора (например, Контроли, буфер для образцов и промывочный буфер) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) в чистом виде очень токсичное и химически активное вещество. В тех концентрациях, в которых оно содержится в реагентах набора, оно не представляет опасности.

Несмотря на классификацию как неопасного вещества, производитель настоятельно рекомендует соблюдать принятые правила работы в лаборатории (см. 8., 9., 10.)

7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большими количествами воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.

8. При обращении с образцами или компонентами набора используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

9. Не отбирайте образцы ртом.

10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор рассчитан на постановку 96 определений.

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых рекомбинантной тканевой трансглутаминазой, готов к использованию	1
Комбинированные калибраторы с IgA классом антител к тканевой трансглутаминазе (A-F) в сывороточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)), содержащие: 6 флаконов IgA: 0; 5; 10; 25; 75; и 200 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к тканевой трансглутаминазе в сывороточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)), положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN_3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл

ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), и поликлональные кроличьи антитела IgA-IgG человека, меченые изотопом хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Хранить набор при 2-8 °С.

Хранить микропланшет в тщательно закрытом пакете с осушителем.

Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.

Не нагревайте реагенты набора, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования набора.

Разведенные буфер для образцов и буфер для промывок стабильны не менее 30 дней при температуре 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или многократный дозатор на 100 мкл

Вортекс

- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Таймер

Программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы цельной крови, с использованием обычных техник, избегая гемолиза.
2. Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Гемолиза или липемии лучше избегать, но они не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 – 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов сыворотки. Это может привести к потере активности аутоантител.
6. Тестирование инактивированных нагреванием образцов не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не смешивайте и не заменяйте компоненты из разных лотов.
3. Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28 °С).
4. Приготовьте все реагенты до начала проведения анализа. После начала тестирования его надо проводить без остановок, для получения наиболее верных и постоянных результатов.
5. Выполняйте все этапы тестирования в том порядке, как это описано в данной инструкции.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. При внесении всех реагентов и образцов пипетируйте прямо на дно ячеек.

предотвращения загрязнения образцов меняйте наконечники перед внесением каждого образца или контроля, используйте одноразовые наконечники.

Для получения лучших результатов очень важно тщательно промывать ячейки, и полностью удалять оставшиеся в ячейках капли буфера для промывок.

Строго соблюдайте время инкубаций.

Контроли следует анализировать как неизвестные образцы для проверки работы реагентов и набора. Не используйте лунки повторно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Готовый буфер для образцов хранится охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.
- Приготовление буфера для промывок
- Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.
- Приготовление образцов
- Разведите все пробы пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте. Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей, калибраторов и предварительно разбавленных проб пациентов
2. Добавьте по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов, в дублиях, в ячейки.
3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте буфером для промывок, по 300 мкл на каждую промывку.

	1	2	3	4	5	6
A	S A	S E	P 1	P 5		
B	S A	S E	P 1	P 5		
C	S B	S F	P 2	P .		
D	S B	S F	P 2	P .		
E	S C	C 1	P 3			
F	S C	C 1	P 3			
G	S D	C 2	P 4	.		

SA-SF:
стандарты от A
до F

P1, P2...C:
образцы
сыворотки пациентов 1,
2 ...

C1:
положительный
контроль

C2: отрицательный
контроль

Н	S	C	P			
	D	2	4			

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.

Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

Слейте содержимое ячеек и трижды промойте буфером для промывок, по 300 мкл на каждую мойку.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.

Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.

Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется

хроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Получившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор ORGENTEC Anti-tissue Transglutaminase Screen ELISA может быть использован с открытыми автоматическими ИФА анализаторами. Процедура анализа, описанная выше, пригодна для постановки вручную, и на автоматическом анализаторе.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест действителен только в том случае, если значения оптической плотности (ОП), при длине волны 450 нм, для положительного контроля (1) и для отрицательного контроля (2), а также для калибраторов А и F, находятся в соответствующих диапазонах, указанных в сертификате контроля качества, прилагаемом к каждому набору! Если какой-либо из этих критериев не выполнен, то результаты считаются недостоверными и тест должен быть повторен.

Расчет результатов

Для расчета результатов данного теста рекомендуется использовать 4-параметрическую регрессию и построение кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

Пример расчета результатов

Данные, приведенные ниже, показывают типичные результаты, полученные с помощью данного метода Anti-tissue Transglutaminase IgA ELISA. Эти данные предназначены только для иллюстрации и не должны быть использованы для расчета результатов какой-либо постановки.

стандарты									
No	лунк	ОП	ОП	Сре	кон	кон	Сре	Зая	С
.	а	1	2	д-нее	ц. 1	ц. 2	д-нее	вле	V
								нна	%
								я	
								кон	
								ц.	

ST 1	A 1/ B 1	0.02 3	0.02 1	0.0 22	0.0	0.0	0.0	0.0	9
ST 2	C 1/ D 1	0.17 4	0.17 4	0.1 74	13	13	13	12	0
ST 3	E 1/F 1	0.33 6	0.33 5	0.3 36	25	25	25	25	0
ST 4	G 1/H 1	0.64 3	0.65 8	0.6 51	49	50	50	50	2
ST 5	A 2/ B 2	1.17 2	1.17 3	1.1 73	101	101	101	100	0
ST 6	C 2/ D 2	1.80 9	1.78 8	1.7 99	201	197	199	200	1

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к трансклутаминазе в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

Антитела к трансклутаминазе

Cut-Off: 10 Ед/мл

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к кардиолиину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к тканевой трансклутаминазе класса IgG и IgA были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом.

TTG	№ образца	разведение	полученное [Ед/мл]	ожидаемое [Ед/мл]	п/о, %
IgA	1	1:100	210.0		
		1:200	102.1	105.1	97
		1:400	55.3	57.6	96
		1:800	27.7	28.8	96
		1:1600	14.9	14.4	103
IgA	2	1:200	180.6		
		1:400	91.7	90.3	101
		1:800	47.2	45.2	104
		1:1600	21.8	22.6	97
		1:3200	11.8	11.3	104
		1:6400	6.1	5.7	110

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии

Между сериями

Среднее [Ед/мл]	CV [%]
35	4.8
87	5.4
155	6.1

Образец №	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	37	5.2
2	82	6.9
3	158	6.3

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к тканевой трансглутаминазе была определена 1,0 Ед/мл

Специфичность

Микропланшет покрыт рекомбинантной tTG. Данным методом распознаются только специфические антитела IgA и IgG к тканевой трансглутаминазе.

Калибровка

Так как не существует международного референс-стандарта аутоантител к тканевой трансглутаминазе, калибровочная система калибруется в относительных условных единицах.

Ограничения метода

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase IgA ELISA предназначен для диагностических целей. Однако окончательный диагноз не должен базироваться только на результатах одного теста, но должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

Интерференция

На результаты анализа не оказывал гемоллиз (до 1000 мг/дл), липемия (до 3 г/дл триглицеридов) или присутствие билирубина (до 40 мг/дл) в сыворотке. Использование различных коагулянтов также не оказывало влияния. Однако, из практических соображений, не рекомендуется использовать сильно гемолизированные или липемичные образцы.

Схема инкубации

IgA -антитела к тканевой трансглутаминазе

Добавить 100 µл стандартов в микроячейки

Контроли 100 µл контролей или проб пациента

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 µл промывочного раствора

Добавить 100 µл раствора ферментного конъюгата
--

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 µл промывочного раствора

Добавить 100 µл раствора субстрата ТМБ
--

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 µл стоп-раствора

Выдержать 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Среднее [Ед/мл]	CV [%]
35	4.8
87	5.4
155	6.1

Образец №	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	37	5.2
2	82	6.9
3	158	6.3

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к тканевой трансглутаминазе была определена 1,0 Ед/мл

Специфичность

Микропланшет покрыт рекомбинантной tTG. Данным методом распознаются только специфические антитела IgA и IgG к тканевой трансглутаминазе.

Калибровка

Так как не существует международного референс-стандарта аутоантител к тканевой трансглутаминазе, калибровочная система калибруется в относительных условных единицах.

Ограничения метода

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase IgA ELISA предназначен для диагностических целей. Однако окончательный диагноз не должен базироваться только на результатах одного теста, но должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

Интерференция

На результаты анализа не оказывал гемоллиз (до 1000 мг/дл), липемия (до 3 г/дл триглицеридов) или присутствие билирубина (до 40 мг/дл) в сыворотке. Использование различных коагулянтов также не оказывало влияния. Однако, из практических соображений, не рекомендуется использовать сильно гемолизированные или липемичные образцы.

Схема инкубации

IgA -антитела к тканевой трансглутаминазе

Добавить
100 µл стандартов в
микроячейки

Контроли
100 µл контролей или проб
пациента

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 µл промывочного раствора

Добавить 100 µл раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 µл промывочного раствора

Добавить 100 µл раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 µл стоп-раствора

Выдержать 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись *Долгов В.В.*
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" _____ 20__ года
Д.М.Н., профессор Долгов В.В.
« ____ » _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgG антител к тканевой трансглутаминазе Anti-Tissue Transglutaminase IgG*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase Screen (анти-тканевая трансглутаминаза Скрин) основан на непрямом твердофазном иммуноферментном методе (ELISA) и предназначен для количественного измерения IgG классов аутоантител к тканевой трансглутаминазе (tTG) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для in vitro диагностики и может быть использован в диагностике целиакии и герпетиформного дерматита.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Впервые целиакия была описана Dr. Samuel Gee в 1888 году. Он отмечал недостаточный рост, хронический понос и вздутие живота как общие признаки болезни у детей. В 1950 годы, с появлением возможности проводить перорально биопсию слизистой, выявлены типичные аномалии слизистой тонкой кишки у пациентов с целиакией. У пациентов, страдающих этим заболеванием, наблюдается атрофия слизистой оболочки с резким укорочением ворсинок и гипертрофией крипт [1].

Больные целиакией могут страдать от диареи, различных желудочно-кишечных проблем, анемии, утомляемости, психиатрических расстройств, или заболевание может протекать бессимптомно. Клинические данные и исследование слизистой после установления безглютеновой диеты являются объективными признаками того, что энтеропатия индуцирована глютеном [2].

Диагностика целиакии основывается на обнаружении патологических изменений в тонком кишечнике при биопсии и позднее верифицируется с помощью безглютеновой диеты, то есть исключением из питания пшеницы, ячменя, ржи, овса и продуктов, содержащих их компоненты.

Приблизительно 10% пациентов, особенно взрослым, для восстановления слизистой необходимы кортикостероиды в дополнение к исключению глютена из рациона. При отсутствии лечения у пациентов, страдающих целиакией, повышен риск развития лимфом или злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта. Более того, даже при отсутствии клинических проявлений, нелеченая на протяжении длительного периода целиакия вызывает предрасположенность к другим аутоиммунным заболеваниям, таким как сахарный диабет, ревматоидные заболевания, аутоиммунный гепатит или тиреоидит.

Повышенная ассоциация целиакии с селективным IgA дефицитом является потенциальной причиной ложноотрицательных результатов анализа IgA. Таким образом, если предполагается целиакия, рекомендуется проводить тестирование аутоантител класса IgG.

Было показано, что фермент тканевая трансглутаминаза (tTG) является основной, если не единственной, мишенью для эндомизимальных антител. Уровень этих антител падает при соблюдении безглютеновой диеты, облегчая этим контроль соблюдения диеты. Анти-tTG IgA являются очень чувствительным маркером целиакии 95-100 % при специфичности 90-97 % [3, 4, 5, 6].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты рекомбинантной тканевой трансглутаминазой. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек

удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие гепатита В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, Контроли, буфер для образцов и промывочный буфер) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) в чистом виде очень токсичное и химически активное вещество. В тех концентрациях, в которых оно содержится в реагентах набора, оно не представляет опасности. Несмотря на классификацию как неопасного вещества, производитель настоятельно рекомендует соблюдать принятые правила работы в лаборатории (см. 8., 9., 10.)
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большими количествами воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
8. При обращении с образцами или компонентами набора используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не отбирайте образцы ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор рассчитан на постановку 96 определений.

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых рекомбинантной тканевой трансклутаминазой, готов к использованию	1
Комбинированные калибраторы с IgG классом антител к тканевой трансклутаминазе (A-F) в сывороточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), содержащие: 6 флаконов IgG: 0; 5; 10; 25; 75; и 200 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый

Контроли антител к тканевой трансглутаминазе в сывороточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела IgG человека, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °С.
2. Хранить микропланшет в тщательно закрытом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не нагревайте реагенты набора, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования набора.
5. Разведенные буфер для образцов и буфер для промывок стабильны не менее 30 дней при температуре 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или многократный дозатор на 100 мкл

Вортекс

- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Таймер

Программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы цельной крови, с использованием обычных техник, избегая гемолиза.
2. Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Гемолиза или липемии лучше избегать, но они не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 – 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов сыворотки. Это может привести к потере активности аутоантител.
6. Тестирование инактивированных нагреванием образцов не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не смешивайте и не заменяйте компоненты из разных лотов.
3. Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28 °С).

4. Приготовьте все реагенты до начала проведения анализа. После начала тестирования его надо проводить без остановок, для получения наиболее верных и постоянных результатов.
5. Выполняйте все этапы тестирования в том порядке, как это описано в данной инструкции.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. При внесении всех реагентов и образцов пипетируйте прямо на дно ячеек.
8. Для предотвращения загрязнения образцов меняйте наконечники перед внесением каждого следующего образца или контроля, используйте одноразовые наконечники.
9. Для получения лучших результатов очень важно тщательно промывать ячейки, и полностью удалять оставшиеся в ячейках капли буфера для промывок.
10. Строго соблюдайте время инкубаций.
11. Контроли следует анализировать как неизвестные образцы для проверки работы реагентов и набора.
12. Не используйте лунки повторно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Приготовление буфера для образцов
- Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Готовый буфер для образцов хранится охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.
- Приготовление буфера для промывок
- Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.

Приготовление образцов

Разведите все пробы пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей, калибраторов и предварительно разбавленных проб пациентов
2. Добавьте по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов, в дублиях, в ячейки.
3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте буфером для промывок, по 300 мкл на каждую промывку.

	1	2	3	4	5	6
A	S	S	P	P		
	A	E	1	5		
B	S	S	P	P		
	A	E	1	5		
C	S	S	P	P.		
	B	F	2	.		
D	S	S	P	P.		
	B	F	2	.		
E	S	C	P			
	C	1	3			

SA-SF:
стандарты от A
до F
P1, P2...C:
образцы
сыворотки пациентов 1,
2 ...

F	S	C	P			
	C	1	3			
G	S	C	P			
	D	2	4			
H	S	C	P			
	D	2	4			

C1:
положительный
контроль
C2: отрицательный
контроль

- Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 - Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 - Удалите содержимое ячеек и трижды промойте буфером для промывок, по 300 мкл на каждую промывку.
 - Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 - Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 - Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
 - Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор ORGENTEC Anti-tissue Transglutaminase Screen ELISA может быть использован с открытыми автоматическими ИФА анализаторами. Процедура анализа, описанная выше, пригодна для постановки вручную, и на автоматическом анализаторе.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест действителен только в том случае, если значения оптической плотности (ОП), при длине волны 450 нм, для положительного контроля (1) и для отрицательного контроля (2), а также для калибраторов А и F, находятся в соответствующих диапазонах, указанных в сертификате контроля качества, прилагаемом к каждому набору! Если какой-либо из этих критериев не выполнен, то результаты считаются недостоверными и тест должен быть повторен.

Расчет результатов

Для расчета результатов данного теста рекомендуется использовать 4-параметрическую регрессию и построение кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

Пример расчета результатов

Данные, приведенные ниже, показывают типичные результаты, полученные с помощью данного метода Anti-tissue Transglutaminase IgA ELISA. Эти данные предназначены только для иллюстрации и не должны быть использованы для расчета результатов какой-либо постановки.

стандарты

No.	лун ка	ОП 1	ОП 2	Сре д- нее	кон ц. 1	кон ц. 2	Сре д- нее	Зая вле нна я кон ц.	С V %
ST A	A 1/B 1	0,08 7	0,08 4	0,0 86	0	0	0	0	2, 5
ST B	C 1/D 1	0,19 3	0,20 4	0,1 99	3,8	4,3	4,1	5	3, 9
ST C	E 1/F 1	0,34 6	0,34 6	0,3 46	10,4	10,4	10,4	10	0, 0
ST D	G1/ H 1	0,58 3	0,58 7	0,5 85	22,2	22,4	22,3	25	0, 5
ST E	A 2/B 2	1,43 0	1,37 1	1,4 01	85,0	79,2	82,1	75	3, 0
ST F	C 2/D 2	2,18 2	2,19 0	2,1 86	192, 4	194, 0	193, 2	200	0, 3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к трансклутаминазе в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

Антитела к трансклутаминазе

Cut-Off: 10 Ед/мл

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к кардиолину.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к тканевой трансклутаминазе класса IgG и IgA были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом.

TTG	№ обра зца	развед ение	получ енное [Ед/мл]	ожид аемое [Ед/м л]	п/о
IgG	1	1:100	196,9	200	98 %
		1:200	103,9	100	104 %
		1:400		50	98 %
			49,0		
		1:800	25,2	25	101 %
IgG	2	1:1600	11,3	12,5	90 %
		1:100	199,3	200	100 %
		1:200	100,8	100	101 %

	1:400	49,8	50	100 %
	1:800	25,8	25	103 %
	1:1600	11,7	12,5	94 %

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			Между сериями		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]	Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	22.1	3.0	1	23.3	8.1
2	39.9	3.8	2	40.1	4.7
3	69.2	4.3	3	71.3	7.0

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к тканевой трансклутаминазе была определена 1,0 Ед/мл

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт рекомбинантной tTG. Данным методом распознаются только специфические аутоантитела IgG к тканевой трансклутаминазе.

КАЛИБРОВКА

Так как не существует международного референс-стандарта аутоантител к тканевой трансклутаминазе, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase IgA ELISA предназначен для диагностических целей.

Однако окончательный диагноз не должен базироваться только на результатах одного теста, но должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

На результаты анализа не оказывал гемолиз (до 1000 мг/дл), липемия (до 3 г/дл триглицеридов) или присутствие билирубина (до 40 мг/дл) в сыворотке. Использование различных коагулянтов также не оказывало влияния. Однако, из практических соображений, не рекомендуется использовать сильно гемолизированные или липемичные образцы.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,
 ЗАО "БиоХимМак"
 тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
 факс (095) 939-09-97
 E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

IgG -антитела к тканевой трансглутаминазе

Добавить
100 μ л стандартов в
микроячейки

Контроли
100 μ л контролей или проб
пациента

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

Выдержать 5 минут

Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" " _____



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgG и IgA антител к тканевой трансглутаминазе Anti-Tissue Transglutaminase Screen*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase Screen (анти-тканевая трансглутаминаза Скрин) основан на непрямом твердофазном иммуноферментном методе (ELISA) и предназначен для одновременного количественного измерения IgG и IgA классов аутоантител к тканевой трансглутаминазе (tTG) в сыворотке или плазме человека. Метод предназначен только для *in vitro* диагностики и может быть использован при диагностике целиакии и герпетиформного дерматита.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Впервые целиакия была описана Dr. Samuel Gee в 1888 году. Он отмечал недостаточный рост, реческий стул и вздутие живота как общие признаки болезни у детей. В 1950 годы, с появлением возможности проводить перорально биопсию слизистой, выявлены типичные аномалии слизистой тонкой кишки у пациентов с целиакией. У пациентов, страдающих этим заболеванием, наблюдается поражение слизистой оболочки с резким укорочением ворсинок и гипертрофией крипт [1].

Больные целиакией могут страдать от диареи, различных желудочно-кишечных проблем, анемии, утомляемости, психиатрических расстройств, или заболевание может протекать бессимптомно. Клинические данные и исследование слизистой после установления безглютеновой диеты являются объективными признаками того, что энтеропатия индуцирована глютеном [2].

Диагностика целиакии основывается на обнаружении патологических изменений в тонком кишечнике при биопсии и позднее верифицируется с помощью безглютеновой диеты, то есть исключением из питания пшеницы, ячменя, ржи, овса и продуктов, содержащих их компоненты.

Приблизительно 10% пациентов, особенно взрослым, для восстановления слизистой необходимы кортикостероиды в дополнение к исключению глютена из рациона. При отсутствии лечения у пациентов, страдающих целиакией, повышен риск развития лимфом или злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта. Более того, даже при отсутствии клинических проявлений, нелеченая на протяжении длительного периода целиакия вызывает предрасположенность к другим аутоиммунным заболеваниям, таким как сахарный диабет, ревматоидные заболевания, аутоиммунный гепатит или тиреоидит.

Повышенная ассоциация целиакии с селективным IgA дефицитом является потенциальной причиной ложноотрицательных результатов анализа IgA. Таким образом, если предполагается целиакия, рекомендуется проводить тестирование аутоантител класса IgG.

Было показано, что фермент тканевая трансглутаминаза (tTG) является основной, если не единственной, мишенью для эндомизиальных антител. Уровень этих антител падает при соблюдении безглютеновой диеты, облегчая этим контроль соблюдения диеты. Анти-tTG IgA являются очень чувствительным маркером целиакии 95-100 % при специфичности 90-97 % [3, 4, 5, 6].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты рекомбинантной тканевой трансклутаминазой. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Peroксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG и IgA антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие гепатита В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, Контроли, буфер для образцов и промывочный буфер) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) в чистом виде очень токсичное и химически активное вещество. В тех концентрациях, в которых оно содержится в реагентах набора, оно не представляет опасности. Несмотря на классификацию как неопасного вещества, производитель настоятельно рекомендует соблюдать принятые правила работы в лаборатории (см. 8., 9., 10.)
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большими количествами воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
8. При обращении с образцами или компонентами набора используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не отбирайте образцы ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор рассчитан на постановку 96 определений.

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых рекомбинантной тканевой трансклутаминазой, готов к использованию	1

Калиброванные калибраторы с IgG и IgA классами антител к тканевой транскламиназе (A-F) в сыровоточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)), содержащие: 6 флаконов	6 флаконов 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (50x).	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела к IgG и IgA человека, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °С.
2. Хранить микропланшет в тщательно закрытом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не нагревайте реагенты набора, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования набора.
5. Разведенные буфер для образцов и буфер для промывок стабильны не менее 30 дней при температуре 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или многократный дозатор на 100 мкл

Вортекс

- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Таймер

Программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы цельной крови, с использованием обычных техник, избегая гемолиза.
2. Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Гемолиза или липемии лучше избегать, но они не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 – 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов сыворотки. Это может привести к снижению активности аутоантител.

Активирование инактивированных нагреванием образцов не рекомендуется.

ПРИМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.

Не смешивайте и не заменяйте компоненты из разных лотов.

Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28 °C).

Приготовьте все реагенты до начала проведения анализа. После начала тестирования его надо проводить без остановок, для получения наиболее верных и постоянных результатов.

Выполняйте все этапы тестирования в том порядке, как это описано в данной инструкции.

Всегда используйте свежие разведения образцов.

При внесении всех реагентов и образцов пипетируйте прямо на дно ячеек.

Для предотвращения загрязнения образцов меняйте наконечники перед внесением каждого следующего образца или контроля, используйте одноразовые наконечники.

Для получения лучших результатов очень важно тщательно промывать ячейки, и полностью удалять оставшиеся в ячейках капли буфера для промывок.

10. Строго соблюдайте время инкубаций.

11. Контроли следует анализировать как неизвестные образцы для проверки работы реагентов и набора.

12. Не используйте лунки повторно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Готовый буфер для образцов хранится охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.

Приготовление буфера для промывок

Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.

Приготовление образцов

Разведите все пробы пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте. Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей, калибраторов и предварительно разбавленных проб пациентов
2. Добавьте по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов, в дублях, в ячейки.
3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте буфером для промывок, по 300 мкл на каждую промывку.

	1	2	3	4	5	6
A	S	S	P	P		
	A	E	1	5		
B	S	S	P	P		
	A	E	1	5		
C	S	S	P	P		
	B	F	2	.		

D	S	S	P	P.		
	B	F	2	.		
E	S	C	P			
	C	1	3			
F	S	C	P			
	C	1	3			
G	S	C	P			
	D	2	4			
H	S	C	P			
	D	2	4			

SA-SF:
стандарты от A
до F
P1, P2...C:
образцы
сыворотки пациентов 1,
2 ...
C1:
положительный
контроль
C2: отрицательный
контроль

- Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте буфером для промывок, по 300 мкл на каждую промывку.
- Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
- Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
- Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор ORGENTEC Anti-tissue Transglutaminase Screen ELISA может быть использован с открытыми автоматическими ИФА анализаторами. Процедура анализа, описанная выше, пригодна для постановки вручную, и на автоматическом анализаторе.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест действителен только в том случае, если значения оптической плотности (ОП), при длине волны 450 нм, для положительного контроля (1) и для отрицательного контроля (2), а также для калибраторов А и F, находятся в соответствующих диапазонах, указанных в сертификате контроля качества, прилагаемом к каждому набору! Если какой-либо из этих критериев не выполнен, то результаты считаются недостоверными и тест должен быть повторен.

Расчет результатов

Для расчета результатов данного теста рекомендуется использовать 4-параметрическую регрессию и построение кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X.

Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

Пример расчета результатов

Данные, приведенные ниже, показывают типичные результаты, полученные с помощью данного теста Anti-tissue Transglutaminase Screen ELISA. Эти данные предназначены только для иллюстрации и должны быть использованы для расчета результатов какой-либо постановки.

стандарты									
No.	лунка	ОП 1	ОП 2	Среднее	конц. 1	конц. 2	Среднее	Заявленная конц.	CV %
ST A	A 1/B 1	0,017	0,018	0,018	0,001	0,001	0	0	4,0
ST B	C 1/D 1	0,166	0,156	1,161	5,3	4,9	5,1	5	4,4
ST C	E 1/F 1	0,272	0,299	0,285	9,6	10,8	10,2	10	6,7
ST D	G1/H 1	0,645	0,614	0,630	27,1	25,5	26,3	25	3,5
ST E	A 2/B 2	1,314	1,393	1,354	69,0	75,1	72,1	75	4,1
ST F	C 2/D 2	2,481	2,437	2,459	201,9	203,8	202,8	200	1,3

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений в образцах сыворотки у здоровых доноров с использованием данного теста были получены следующие значения:

нормальные: < 15

положительные: > 15

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к тканевой трансглутаминазе. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к тканевой трансглутаминазе класса IgG и IgA были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом.

TTG	№ образца	разведение	полученное [Ед/мл]	ожидаемое [Ед/мл]	п/о
Скрин	1	1:200	13,2		
		1:400	7,5	6,6	88 %

		1:800		3,3	92 %
		1:1600	3,6	1,4	118 %
Скри	2	1:200	58,6		
н		1:400	31,4	29,3	93 %
		1:800	16,6	14,6	88%
		1:1600	7,0	7,3	104%

Производительность

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводительность между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			Между сериями		
Обр а- зец No	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]	Обр а- зец No	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]
1	19,7	2,7	1	19,3	10,3
2	38,9	3,2	2	35,8	6,0
3	74,8	2,7	3	69,3	7,7
4	142,8	4,0	4	137,9	6,1

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к тканевой трансглутаминазе была определена 1,0 Ед/мл

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт рекомбинантной tTG. Данным методом распознаются только специфические аутоантитела IgA и IgG к тканевой трансглутаминазе.

КАЛИБРОВКА

Так как не существует международного референс-стандарта аутоантител к тканевой трансглутаминазе, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase Screen ELISA предназначен для диагностических целей.

Однако окончательный диагноз не должен базироваться только на результатах одного теста, но должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

На результаты анализа не оказывал гемолиз (до 1000 мг/дл), липемия (до 3 г/дл триглицеридов) или присутствие билирубина (до 40 мг/дл) в сыворотке. Использование различных коагулянтов также не оказывало влияния. Однако, из практических соображений, не рекомендуется использовать сильно гемолизированные или липемичные образцы.

Информация для заказа

119, Москва, Ленинские горы,
«БиоХимМак»
(095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
(095) 939-09-97
e-mail: info@biochemmack.ru

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И МЕТОДИКА РАБОТЫ

Добавить
100 мкл стандартов в
микроячейки

Контроли
100 мкл контролей или проб
пациента

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре
удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 мкл промывочного раствора

Добавить 100 мкл раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре
удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 мкл промывочного раствора

Добавить 100 мкл раствора субстрата ТМБ

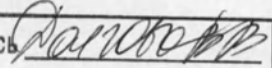
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 мкл стоп-раствора

Выдержать 5 минут
Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

Подпись 
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
« ____ » _____ года




д.м.н., профессор Долгов В.В.
« ____ » _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

2 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к протромбину классов IgG и IgM

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Protrombin IgG/IgM предназначен для количественного определения IgG и IgM аутоантител к протромбину в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики in vitro с целью диагностики риска возникновения тромбозов у пациентов, страдающих системной красной волчанкой или волчаночными заболеваниями.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Антифосфолипидные антитела ассоциируются с венозными и артериальными тромбозами, а также с хроническим невынашиванием беременности. У пациентов с подобной симптоматикой и высокими уровнями антител к фосфолипидам диагностируют антифосфолипидный синдром (АФС). АФС может проявляться у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) или другими аутоиммунными заболеваниями (вторичный АФС), или у пациентов без предшествующих аутоиммунных процессов (вторичный АФС).

В клинической практике иммуноферментное определение антител к кардиолипину является одним из наиболее ценных и стандартизированных тестов для диагностики АФС.

Недавно семейство антифосфолипидных антител было расширено за счет включения гетерогенной группы антител, которые специфичны по отношению к фосфолипид-связывающим белкам или их комплексу с фосфолипидами.

Среди фосфолипид-связывающих белков наиболее изучен $\beta 2$ -гликопротеин I ($\beta 2$ -GP1). Другой фосфолипид-связывающий белок протромбин (фактор II свертывания), обладает прокоагулянтной активностью через образование протромбиназного комплекса, который инициирует превращение фибриногена в фибрин.

Антитела могут ингибировать образование тромбокиназного комплекса.

Этот комплекс формируется связыванием протромбина с фосфолипидами на поврежденной мембране, где протромбин затем энзиматически превращается в тромбин. Сам тромбин является причиной свертывания крови. Антитела, специфично направленные против факторов свертывания, например, антипротромбиновые антитела, это патогенные антитела, циркулирующие в кровяном русле, они непосредственно ингибируют факторы свертывания и таким образом удлиняют время коагуляции. Эти аутоантитела также ассоциированы с аутоиммунными заболеваниями.

Наличие аутоантител к протромбину связано с тромбозом у пациентов с СКВ и АФС. Было также найдено, что высокие уровни антител к протромбину связаны с риском глубокого тромбоза вен, легочной эмболии, и данные антитела могут быть вовлечены в развитие тромботических процессов. Кроме того, было показано, что повышение концентрации антител к протромбину является прогностическим фактором риска инфаркта миокарда.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным протромбином. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG или IgM человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания.

звитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 50 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG и IgM антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно мойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным протромбином. Готов для использования.	1
Комбинированные калибраторы с антителами к протромбину классов IgG и IgM в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 6 флаконов 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 Ед/мл. Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к протромбину в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x). Готов для использования.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон

	15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50х)	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвержайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течений 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °С) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микроплшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
12. Не используйте лунки микроплшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Добавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните при температуре до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Добавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните при температуре до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К), калибраторов (С) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения одного класса антител добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки. Для определения обоих классов: IgG и IgM-антител пипетируйте калибраторы, контроли и образцы дважды.

	1	2	3	4	5	6
a	SA	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от А до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
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			

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата (анти-IgA) в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

Примет расчетов

В таблице ниже приведены типичные результаты, полученные при анализе данным методом Anti-Protrombin IgG/IgM. Эти данные приведены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов какого-либо анализа.

Стандарты									
No	Позиция	ОП 1	ОП 2	Средне е	Конц. 1	Конц. 2	Средне е	декл. конц. %	CV
ST 1	A1 / A2	0.038	0.039	0.038	0.001	0.001	0.001	0.001	2
ST 2	B1 / B2	0.227	0.232	0.229	7.1	7.3	7.2	6.3	1
ST 3	C1 / C2	0.388	0.395	0.391	12.6	12.8	12.7	12.5	1
ST 4	D1 / D2	0.744	0.764	0.754	25.0	25.7	25.3	25	2
ST 5	E1 / E2	1.336	1.306	1.321	49.0	47.7	48.3	50	1
ST 6	F1 / F2	2.209	2.226	2.218	100.8	102.1	101.4	100	0

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений антител к протромбину с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к протромбину [Ед/мл]
нормальный уровень	<10
повышенный уровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к протромбину. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Оборотки с высокой концентрацией антител к протромбину были разведены буфером для образцов и анализированы. Результаты анализа были линейны во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Антипротромбин IgG		
Внутри серии		
Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	9.5	3.8
2	18.3	4.2
3	31.9	3.3

Антипротромбин IgM		
внутри серии		
Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	13.7	3.9
2	23.7	4.2
3	42.9	4.0

Антипротромбин IgG		
между сериями		
Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	10.4	9.3
2	19.0	5.2
3	34.1	6.0

Антипротромбин IgM		
между сериями		
Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	14.4	8.0
2	24.8	5.9
3	45.5	8.2

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к протромбину класса IgG и IgM – 1.0 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенным протромбином. Специальная технология нанесения антигенов в ячейки гарантирует нативную иммуногенную структуру протромбина после иммобилизации на твердой фазе. Данный набор специфичен для аутоантител к протромбину.

Калибровка

До тех пор, пока не появится международный референс-стандарт для антипротромбиновых антител, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Protrombin IgG/IgM может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз до 1000 мг/дл
Липемия до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин до 40 мг/дл
Антикоагулянты в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

Антитела к протромбину (IgG/IgM)

Контроли
100 мкл контролей или проб
пациента

Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить	100 мкл	раствора ферментного конъюгата
----------	---------	--------------------------------

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 мл стоп-раствора

□ Выдержать 5 минут

□ Считать при 450 нм

**Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»**

д.м.н., профессор Долгов В.В.
« » 2011г.

Подпись Васильев _____
 удостоверяю:
 Специалист по кадрам МАПО
 Подпись _____
 " ____ " _____ года

Печать: Российская Федерация, Министерство образования, МАПО, 30

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.

"BioChemMax"

МОСКВА

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к протромбину класса IgA

НАИМЕНОВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ МЕТОДА

Данный метод Anti-Prothrombin IgA основан на непрямом твердофазном иммуноферментном методе (ELISA) и предназначен для количественного определения аутоантител класса IgA к протромбину в человеческой сыворотке или плазме.

Набор предназначен только для диагностики *in vitro* с целью выявления повышенного риска развития тромбоза у больных системной красной волчанкой (SLE) или другими подобными заболеваниями.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Антифосфолипидные антитела (aPL) ассоциируются с венозными и артериальными тромбозами, а также с хроническим невынашиванием беременности. У пациентов с подобной симптоматикой и высокими уровнями антител к фосфолипидам диагностируют антифосфолипидный синдром (АФС, APS). АФС может проявляться у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) или другими аутоиммунными заболеваниями (вторичный АФС), или у пациентов без предшествующих аутоиммунных процессов (первичный АФС).

В клинической практике иммуноферментное определение антител к кардиолипину является одним из наиболее ценных и стандартизированных тестов для диагностики АФС.

Недавно семейство антифосфолипидных антител было расширено за счет включения гетерогенной группы антител, которые специфичны по отношению к фосфолипид-связывающим белкам или их комплексу с фосфолипидами.

Среди фосфолипид-связывающих белков наиболее изучен $\beta 2$ -гликопротеин I ($\beta 2$ -GP1). Другой фосфолипид-связывающий белок протромбин (фактор II свертывания), обладает прокоагулянтной активностью, путем образования протромбиназного комплекса, который инициирует превращение фибриногена в фибрин.

Антитела могут ингибировать образование тромбокиназного комплекса. Этот комплекс формируется связыванием протромбина с фосфолипидами на поврежденной мембране, где протромбин затем энзиматически превращается в тромбин. Сам тромбин является причиной свертывания крови. Антитела, специфично направленные против факторов свертывания, например, антипротромбиновые антитела, это патогенные антитела, циркулирующие в кровяном русле, они непосредственно ингибируют факторы свертывания и таким образом удлиняют время коагуляции. Эти аутоантитела также ассоциированы с аутоиммунными заболеваниями.

Наличие аутоантител к протромбину связано с тромбозом у пациентов с СКВ и АФС. Было также найдено, что высокие уровни антител к протромбину связаны с риском тромбоза глубоких вен, легочной эмболии, и данные антитела могут быть вовлечены в развитие тромботических процессов. Кроме того, было показано, что повышение концентрации антител к протромбину является прогностическим фактором риска инфаркта миокарда.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лунки планшета покрыты высокоочищенным протромбином. В ходе анализа происходит связывание аутоантител, присутствующих в разведенной сыворотке или плазме, с антигеном. После инкубации лунки промывают, при этом удаляются все несвязавшиеся компоненты сыворотки или плазмы. Конъюгат антител к человеческим IgA к пероксидазой хрена (HRP) иммунологически связывается со связавшимися аутоантителами из образцов, при этом образуются комплексы конъюгат/антитело/антиген. При последующей промывке удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием желтого конечного продукта. Интенсивность желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Она прямо пропорциональна концентрации IgA аутоантител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены только для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМВ попал на кожу, тщательно промойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. В чистом виде азид натрия (NaN_3) высоко токсичное и активное вещество. В онцентрациях, в которых азид натрия присутствует в реагентах набора (0,09%), он не опасен. Несмотря на это, при работе настоятельно рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большим количеством воды для разведения компонентов до концентрации ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте инструкции по выполнению контроля качества медицинских лабораторных исследований, анализируйте контроли и/или пулированные сыворотки. При работе со всеми реагентами набора, контролями и образцами сывороток соблюдайте существующие региональные требования.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным протромбином. Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы (A-F) с антителами к протромбину класса	6 флаконов

IgA в сывороточно-буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 6 флаконов 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 Ед/мл. Готовы к использованию.	1,5 мл каждый
Контроли антител к протромбину в сывороточно-буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны в спецификации к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x)	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела к IgA человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буфер для промывок (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат (50x).	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2 - 8 °C
2. Храните неиспользованные стрипы микропланшета в хорошо закрытом пакете с осушителем.
3. Все компоненты стабильны до срока годности, указанного на этикетках.
4. Не подвергайте компонента набора нагреванию, попаданию солнечных лучей или яркого света во время работы или хранения.
5. Разведенные буфер для образцов и буфер для промывок стабильны при температуре 2-8°C не менее 30 дней после приготовления.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с возможностью считывания по конечной точке при длине волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение

Приготовление реагентов

- дистиллированная или деионизированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения буфера для промывок

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите кровь обычной венопункцией в вакутейнеры, избегайте гемолиза.
2. отделите сыворотку центрифугированием после образования сгустка.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Рекомендуются избегать гемолиза или липемии, хотя они не оказывают существенного влияния на анализ данным методом.

Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C в течение 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов сывороток. Это может привести к потере (в различной степени) активности аутоантител.

Не рекомендуется тестировать сыворотки, инактивированные нагреванием.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты наборов различных лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C).
4. Перед началом тестирования необходимо подготовить все реагенты и образцы. Для получения наиболее достоверных и воспроизводимых результатов анализ должен быть выполнен без остановок.
5. Выполняйте все этапы протокола так, как они описаны в данной инструкции.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Вносите все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Для того, чтобы избежать контаминации меняйте наконечники перед внесением каждого образца или контроля.
9. Для получения наилучших результатов очень важна тщательная промывка лунок и полное удаление жидкости из лунок на всех этапах промывки.
10. Точно соблюдайте интервалы времени во время всех инкубаций.
11. Необходимо постоянно тестировать контрольные сыворотки или пулы одновременно с образцами, для проверки пригодности реагентов и правильности выполнения метода.
12. Не используйте лунки микропланшета повторно!

Концентрации всех поставляемых контролей указаны на этикетках флаконов. Эти концентрации можно использовать для полуколичественных расчетов концентраций в образцах сывороток пациентов.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разведите содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным: при 2-8°C стабилен по крайней мере 30 дней после приготовления или до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом буфера для промывок дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным: при 2-8°C стабилен по крайней мере 30 дней после приготовления или до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Разведение образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 1000 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте. Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разведенных образцов сывороток пациентов.
2. Внесите в лунки по 100 мкл калибраторов, контролей и предварительно разведенных образцов сывороток пациентов.

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

a	CA	CE	P1	P5		
b	CA	CE	P1	P5		
c	CB	CF	P2	P..		
d	CB	CF	P2	P..		
e	CC	K1	P3			
f	CC	K1	P3			
g	CD	K2	P4			
h	CD	K2	P4			

CA-CF: калибраторы от А до F

P1, P2...C: образцы сывороток пациентов, 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое лунок и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку.
5. Добавьте по 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое лунок и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Результаты тестирования данным методом считаются достоверными только в случае, если значение оптической плотности (ОП), полученные для положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2) при 450 нм, а также значения ОП для калибраторов (от А до F) попадают в соответствующие диапазоны, указанные в сертификате контроля качества, поставляемом с каждым набором! Если какой-либо из критериев не выполнен, результаты считаются недостоверными и тестирование должно быть выполнено еще раз.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется использовать 4-параметрическую аппроксимацию для построения кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X.

Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах сывороток пациентов.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgA к протромбину. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (С)										
No	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср едн ее	Ко нц 1 яч.	Ко нц 2 яч.	Ср едн ее	Заяв л. Кон ц.	С V %	
ST A	A 1/A 2	0.03 8	0.0 39	0.0 38	0,0 01	0,0 01	0,0 01	0,00 1	2	
ST B	B 1/B 2	0.22 7	0.2 32	0.2 29	7.1 0	7.3 7	7.2 3	6.3 0	1	
ST C	C 1/C 2	0.38 8	0.3 95	0.3 91	12. 6	12. 8	12. 7	12.5 0	1	
ST D	D 1/D 2	0.74 4	0.7 64	0.7 54	25. 0	25. 7	25. 3	25 0	2	
ST E	E 1/E 2	1.33 6	1.3 06	1.3 21	49. 0	47. 7	48. 3	50 0	1	
ST F	F 1/F 2	2.20 9	2.2 26	2.2 18	100 .8	102 .1	101 .4	100 0	0	

Интерпретация результатов

При исследовании нормального диапазона значений IgA антител к протромбину с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела IgA к протромбину [Ед/мл]
нормальный уровень	<10
повышенный уровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуются каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сыровоточных антител к протромбину. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Линейность разведения

В исследованиях по разведению сыворотки с высокими концентрациями аутоантител класса IgA разводили буфером для образцов и тестировали данным методом. Метод показал линейность разведения на всем диапазоне измеряемых начений.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Антипротромбин IgA					
Внутри серии			между сериями		
Обр а- зец №	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]	Обр а- зец №	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]
1	16.9	6.6	1	16.8	6.9
2	31.3	3.8	2	32.8	4.2
3	58.7	3.8	3	55.5	8.6

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к протромбину класса IgA – 1.0 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Лунки микропланшета покрыты высокоочищенным протромбином. Специальная технология нанесения антигенов в лунки гарантирует нативную иммуногенную структуру протромбина после иммобилизации на твердой фазе. Данный набор специфичен для аутоантител к протромбину.

КАЛИБРОВКА

Так как не существует международного референс-стандарта для антипротромбиновых антител, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

Ограничения метода

Метод Anti-Prothrombin IgA ELISA является диагностическим инструментом. Точный клинический диагноз не должен основываться только на результатах единичного исследования, а должен быть поставлен врачом по результатам полного клинического и лабораторного обследования пациента.

Влияющие вещества

Гемолиз (до 1000 мг/дл), липемия (до 3 г/дл триглицеридов) или билирубин (до 40 мг/дл) не оказывают влияния на результаты анализа данным методом. Никакой интерференции не наблюдалось при использовании различных антикоагулянтов. Однако не рекомендуется тестировать образцы с сильной липемией или гемолизом.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов



Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата



Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и трижды промойте, используя по 300 мкл буфера для промывок на лунку

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ



Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора



Выдержите 5 минут



Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) класса IgG и IgA

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения антител класса IgG и IgA к маннан *Saccharomyces cerevisiae* методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях диагностики болезни Крона.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Точная диагностика заболеваний внутренних органов человека (IBD), в частности, дифференциальная диагностика между двумя основными заболеваниями, язвенным колитом и болезнью Крона, важна для адекватного лечения и прогноза. Язвенный колит характеризуется воспалением и поражением верхнего слоя внутренней поверхности толстой и прямой кишки. Болезнь Крона вызывает обычно распространенное воспаление желудочно-кишечного тракта с образованием гранул, глубоко проникающих в пораженную ткань. Воспаление при болезни Крона асимметричное и сегментальное, с чередованием здоровых и пораженных тканей, в отличие от язвенного колита, при котором воспаление симметрично и непрерывно от проксимального отдела прямой кишки [1]. Для дифференциальной диагностики болезни Крона и язвенного колита могут быть использованы определения ANCA (антитела к цитоплазме нейтрофилов) и ASCA (антитела к *Saccharomyces cerevisiae*). ASCA направлены к олигосахаридным эпитопам маннан клеточной стенки (фосфопептидоманнан) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [2]. IgG, также как IgA ASCA имеют примерно 95-100% специфичности по отношению к болезни Крона. ASCA строго ассоциированы с болезнью Крона. Исследования показали только 5% ASCA IgG-положительных и 7% ASCA IgA-положительных результатов при язвенном колите, тогда как при болезни Крона чувствительность составляет 75% для IgG ASCA и 60% для IgA ASCA [3, 4]. Встречаемость атипичной ANCA (aANCA) при болезни Крона более редкая по сравнению с язвенным колитом. Распространенность ANCA варьирует от 50% до 90% при язвенном колите и от 10% до 20% при болезни Крона [5]. Комбинация двух серологических тестов делает возможной быструю и неинвазивную дифференциальную диагностику болезни Крона и язвенного колита.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом маннан *Saccharomyces cerevisiae*. Присутствующие в образцах антитела связываются с иммобилизованными в микрокамерках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG или IgA человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с антителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетс с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора, при этом Раствор меняет цвет на желтый.

Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG или IgA антител в образце.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы людьми, 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.

Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно мойте водой с мылом.

Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).

7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.

8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

9. Не отбирайте образцы ртом

10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых особо чистым препаратом маннан <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Готов к использованию.	1
Калибраторы с IgG и IgA антителами ASCA (A-F) в сывороточно/буферном (PBS/BSA, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)) матриксе, содержащие IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 Ед/мл, IgA: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 Ед/мл. Готовы к использованию	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к ASCA в сывороточно-буферном (PBS/BSA, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 $< 0,5\%$ (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл

раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (пероксидазы хрена-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-пероксидазные IgA антитела, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
промывочный раствор, концентрат 50х, Готов к использованию	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке

Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.

Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.

Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.

Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл

Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Лабораторный таймер

программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.

...дистиллята, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции

...да используйте свежеприготовленные разведения образцов

...несите все образцы на дно лунок

...избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей

...достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки полностью удалите остатки буфера из лунок.

Необходимо соблюдать время всех инкубаций

Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.

Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разбавьте все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.
2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от A до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 - позитивный контроль;
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			

f	S C	C1	P3		
g	S D	C2	P4		
h	S D	C2	P4		

- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28 °C).
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется фотометрическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
- Считайте оптическую плотность за это время.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1) Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации сплайнами.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерения в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых антител в образцах пациентов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании нормального диапазона значений в сыворотках здоровых доноров данным методом получены следующие значения:

ASCA :	IgA [Ед/мл]	IgG [Ед/мл]	
норма:	< 10	< 10	повышенные значения:
> 10	> 10		

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии ASCA.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

ность

Результаты трех сывороток были проанализированы двумя наборами. Результаты приведены в таблицах.

ASCA IgG

Образец №	Разведение	Полученное [Ед/мл]	П/О
1	1:100	98,0	100 %
	1:200	43,0	88%
	1:400	20,5	84%
2	1:100	85,8	100%
	1:200	36,1	84%
	1:400	17,4	81%
3	1:100	46,3	100%
	1:200	20,9	90%
	1:400	9,8	85%

ASCA IgA

Образец №	Разведение	Полученное [Ед/мл]	П/О
1	1:100	28,7	100%
	1:200	15,1	105%
	1:400	7,5	105%
2	1:100	30,6	100%
	1:200	16,1	105%
	1:400	8,4	110%
3	1:100	37,1	100%
	1:200	15,3	82%
	1:400	5,8	63%

Воспроизводимость

Статистика для коэффициентов вариации (CV) была рассчитана для каждого из 4 образцов в 32 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии, воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 3 различных опытов по 24 определений каждого образца:

ASCA IgG, Внутри серии

Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	9.6	4.3
2	19.3	6.6
3	76.5	8.8

ASCA IgA, Внутри серии

Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	5.1	5.2
2	26.8	6.5
3	66.4	6.1

ASCA IgG, Между сериями		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	10.5	7.1
2	31.2	3.8
3	67.3	7.5

ASCA IgA, Между сериями		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	5.9	6.6
2	29.1	6.0
3	81.2	6.4

Чувствительность

Нижняя граница определения для ASCA составляет 1 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт особо чистым препаратом маннан *Saccharomyces cerevisiae*. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к этому фосфопептиду.

Калибровка

Поскольку не существует международно-признанного стандарта ASCA, тест-система прокалибрована в относительных единицах.

Ограничения метода

1. ASCA ELISA может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.
2. Отрицательный результат не является гарантией отсутствия болезни Крона.
3. Положительный результат не обязательно указывает на наличие болезни Крона.

Интерференция

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,
 ЗАО "БиоХимМак"
 тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
 факс (095) 939-09-97
 E-mail: info@biochemmack.ru

Схема инкубации

ASCA

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

мойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

мойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к протромбину классов IgG, IgM и IgA.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-Protrombin Screen предназначен для количественного определения IgG, IgM и IgA аутоантител к протромбину в человеческой сыворотке или плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики in vitro с целью диагностики риска возникновения тромбозов у пациентов, страдающих системной красной волчанкой или волчаночными заболеваниями.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Антифосфолипидные антитела ассоциируются с венозными и артериальными тромбозами, а также с хроническим невынашиванием беременности. У пациентов с подобной симптоматикой и высокими уровнями антител к фосфолипидам диагностируют антифосфолипидный синдром (АФС). АФС может проявляться у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) или другими аутоиммунными заболеваниями (вторичный АФС), или у пациентов без предшествующих аутоиммунных процессов (вторичный АФС).

В клинической практике иммуноферментное определение антител к кардиолипину является одним из наиболее ценных и стандартизированных тестов для диагностики АФС.

Недавно семейство антифосфолипидных антител было расширено за счет включения гетерогенной группы антител, которые специфичны по отношению к фосфолипид-связывающим белкам или их комплексу с фосфолипидами.

Среди фосфолипид-связывающих белков наиболее изучен $\beta 2$ -гликопротеин I ($\beta 2$ -GP1). Другой фосфолипид-связывающий белок протромбин (фактор II свертывания), обладает прокоагулянтной активностью через образование протромбиназного комплекса, который инициирует превращение фибриногена в фибрин.

Антитела могут ингибировать образование тромбокиназного комплекса. Этот комплекс формируется связыванием протромбина с фосфолипидами на поврежденной мембране, где протромбин затем энзиматически превращается в тромбин.

Сам тромбин является причиной свертывания крови. Антитела, специфично направленные против факторов свертывания, например, антипротромбиновые антитела, это патогенные антитела, циркулирующие в кровяном русле, они непосредственно ингибируют факторы свертывания и таким образом удлиняют время коагуляции. Эти аутоантитела также ассоциированы с аутоиммунными заболеваниями.

Наличие аутоантител к протромбину связано с тромбозом у пациентов с СКВ и АФС. Было также найдено, что высокие уровни антител к протромбину связаны с риском глубокого тромбоза вен, легочной эмболии, и данные антитела могут быть вовлечены в развитие тромботических процессов. Кроме того, было показано, что повышение концентрации антител к протромбину является прогностическим фактором риска инфаркта миокарда.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для количественного определения аутоантител классов классов G, M и A к протромбину. Ячейки планшета покрыты высокоочищенным протромбином. Планшет может быть разделен на 12 стрипов по 8 ячеек каждый или может быть использован сразу для 96 определений. Каждая ячейка может быть отделена от стрипа ("break-away"). В ходе анализа происходят связывание присутствующих аутоантител, образование сэндвичевого комплекса и ферментная цветная реакция в следующих фазах реакции:

Фаза 1:

Калибраторы, контроли и предварительно разбавленные пробы сыворотки пациентов вносятся в микроячейки. Любые присутствующие антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. После 30-минутной инкубации ячейки промываются, при этом промывочный раствор удаляет несвязавшиеся компоненты сыворотки.

Фаза 2:

Смешанный раствор конъюгатов античеловеческого анти-IgG, анти-IgA и анти-IgM с пероксидазой хрена добавляется в ячейки для определения аутоантител, связанных с иммобилизованными антигенами. После 15-минутной инкубации избыток ферментного конъюгата удаляется промывочным раствором.

Фаза 3:

Раствор хромогенного субстрата, содержащий ТМБ, добавляется в ячейки. В течение 15-минутной инкубации цвет раствора становится голубым. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG /IgM/IgA-антител в образце.

Необходимо считать оптическую плотность при 450 нм. Рекомендуется бихроматический режим с фильтром сравнения 600 - 690 нм.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
9. Не пипетируйте ртом
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

II. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным протромбином. Готов для использования.	1
Комбинированные калибраторы с антителами к протромбину классов IgG, IgM и IgA в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 6 флаконов 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 Ед/мл. Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к протромбину в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат. Готов для использования.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)) (светло-красный), содержащий смесь поликлональных кроличьих античеловеческих IgG-IgG, IgM-IgG и IgA-IgG антитела, меченых пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течений 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
12. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием.
Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К), калибраторов (С) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения одного класса антител добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от А до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата (анти-IgA) в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

интерпретация РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом

к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

Пример расчетов

В таблице ниже приведены типичные результаты, полученные при анализе данным методом Anti-Protrombin IgG/IgM. Эти данные приведены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов какого-либо анализа.

Стандарты									
No	Позиция	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	декл. конц.	CV %
ST1	A1 / B1	0.124	0.109	0.116	0.6	0.5	0.6	0	9.1
ST2	C1 / D1	0.199	0.207	0.203	6.0	6.4	6.2	6.3	2.8
ST3	E1 / F1	0.325	0.343	0.334	12.2	13.0	12.6	12.5	3.8
ST4	G1 / H1	0.603	0.649	0.626	23.7	25.6	24.6	25	5.2
ST5	A2 / B2	1.300	1.210	1.255	52.5	48.5	50.5	50	5.1
ST6	C2 / D2	2.124	2.178	2.151	97.7	101.5	99.6	100	1.8

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений антител к протромбину с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к протромбину [Ед/мл]
Cut - off	20

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально. Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к протромбину. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к протромбину были разведены буфером для образцов и проанализированы. Результаты анализа были линейны во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Антипротромбин Скрин		
Внутри серии		
Обр а- зец No	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]
1	16.5	6.0
2	32.8	2.2
3	64.0	3.2

Антипротромбин Скрин		
внутри серии		
Обр а- зец No	Сред нее [Ед/м л]	CV [%]
1	17.2	9.4
2	32.9	2.0
3	63.9	3.8

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к протромбину класса IgG и IgM – 1.0 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенным протромбином. Специальная технология нанесения антигенов в ячейки гарантирует нативную иммуногенную структуру протромбина после иммобилизации на твердой фазе. Данный набор специфичен для аутоантител к протромбину.

Калибровка

До тех пор, пока не появится международный референс-стандарт для антипротромбиновых антител, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Protrombin IgG/IgM может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз до 1000 мг/дл
Липемия до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин до 40 мг/дл
Антикоагулянты в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

титела к протромбину (IgG/IgM)

Добавить
100 μ л стандартов в
микроячейки

Контроли
100 μ л контролей или проб
пациента

☐ ☐
Инкубировать 30 минут при комнатной температуре

☐
Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

☐
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

☐
Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

☐
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

☐
Выдержать 5 минут

☐
Считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Подпись Долгов В.В.
удостоверяю:
Специалист по кадрам М.И.Д.
Подпись _____
"___" _____



Всего прошито

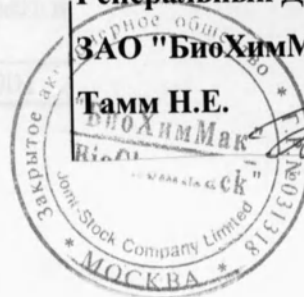
и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgA антител к диамидированным пептидам глиадина (анти-DGP IgA)*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-DGP IgA предназначен для количественного определения IgA аутоантител к DGP в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro* у пациентов с предполагаемым диагнозом целиакия.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Целиакия (синонимы: глютенная болезнь, глютенная энтеропатия, глютеночувствительная целиакия) – это энтеропатия, при которой развивается воспаление и атрофия ворсинок тонкого кишечника. В патогенезе этого заболевания лежит непереносимость глютена. Заболевание сопровождается аутоиммунным процессом, запускающимся и сохраняющимся у людей с генетической предрасположенностью при приеме пищи, содержащей глютен (пшеница, рожь, ячмень и т.д.) [1] [2].

Целиакия встречается у примерно 1% населения, в любом возрасте [3] [4], и часто остается недиагностированным из-за большого различия симптомов. Кроме типичных клинических проявлений целиакии, таких как признаки синдрома мальабсорбции (хроническая диарея, метеоризм, потеря веса и т.д.), с ней часто ассоциированы нетипичные заболевания или симптомы, такие как герпетический дерматит, диабет 1 типа, остеопороз, некоторые лимфомы, дефицит железа, хроническая усталость, невынашиваемость. Иногда симптомы плохо выражены или отсутствуют [5] [6].

Патогенез целиакии до конца еще не ясен. После всасывания глиадин (из глютена) диамидируется тканевой трансаминазой (tTG) в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, что приводит к замещению остатков глутамина остатками глутаминовой кислоты. Фрагменты глиадина (диамидированные пептиды глиадина) связываются с молекулами HLA антигенпрезентирующих клеток, где они распознаются соответствующими Т-хелперными клетками. В

В результате этого процесса развивается иммунный ответ и образуются антитела к DGP, дополнительно к антителам, образующимся к tTG [7] [8]. Определение этих антител (IgA, IgG) может быть использовано, совместно с клиническими наблюдениями и другими лабораторными исследованиями для постановки диагноза целиакии. ИФА методы, основанные на использовании нативного белка в качестве антигена для выявления антител к глиадину, обладают не очень высокой диагностической точностью. В отличие от других методов, данный метод основан на использовании эпитопов диамидированных пептидов глиадина (DGP) в качестве антигена, что обеспечило данному методу исключительно высокую диагностическую значимость [9] [10].

В сыворотке больных целиакией выявляются оба класса антител, и IgA, и IgG к глиадину [11]. Так как у значительной части больных наблюдается дефицит IgA [12], чувствительный скрининг групп риска включает определение и IgA, и IgG антител. С помощью определения IgA антител можно оценить активность заболевания и мониторить соблюдение безглютеновой диеты [13].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лунки планшета покрыты диамидированными пептидами глиадина. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке или плазме, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgA человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует в образовании голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора.

Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgA антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
 8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
 9. Не пипетируйте ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.
- В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенными DGP. Готов для использования.	1
Комбинированные калибраторы (A-F) с антителами к -DGP класса IgA в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) содержащие: 6 флаконов 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 Ед/мл. Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к DGP в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN_3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x). Готов для использования.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течений 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
12. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К), калибраторов (С) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения одного класса антител добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки.

	1	2	3	4	5	6
a	SA	SE	P1	P5		SA-SF -
b	SA	SE	P1	P5		стандарты от А до
c	SB	SF	P2	P..		F;
d	SB	SF	P2	P..		P1, P2...- образцы
e	SC	C1	P3			пациентов 1, 2 ...;
f	SC	C1	P3			C1 – позитивный
g	SD	C2	P4			контроль;
h	SD	C2	P4			C2 – негативный
						контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений антител к DGP с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к DGP [Ед/мл]
нормальный уровень	<10
повышенный уровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны титров антител к DGP. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к DGP были разведены буфером для образцов и проанализированы. Результаты анализа были линейны во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 2 различных опытов по 16 определений каждого из трех образцов:

Анти-DGP		
Внутри серии		
Образец №	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	28.9	5.0
2	55.0	6.5
3	75.1	5.7

Анти-DGP		
между сериями		
Образец №	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	65.3	4.1
2	87.4	8.1
3	29.6	2.3
4	4.7	6.1

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к DGP класса IgA – 0.5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенными DGP. Данный набор специфичен для аутоантител к DGP.

Калибровка

Так как не существует международного стандарта анти-DGP антител, данный метод прокалиброван в условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-DGP IgA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз до 1000 мг/дл
Липемия до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин до 40 мг/дл
Антикоагулянты в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО "БиоХимМак"
тел. (495) 647-27-40, факс (495) 939-09-97
info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к DGP

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

↓
Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

↓
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

↓
Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

↓
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора субстрата

↓
Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

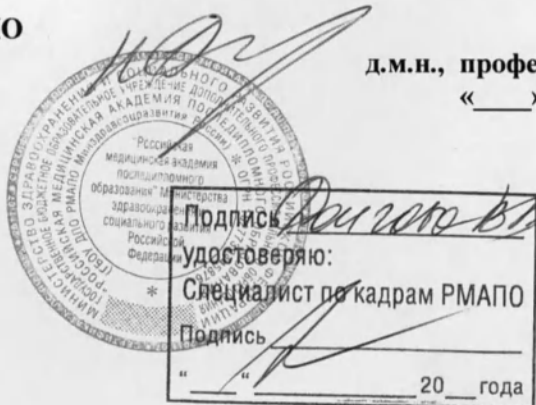
↓
Выдержите 5 минут

↓
Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

**Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»**

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.



Всего прошито

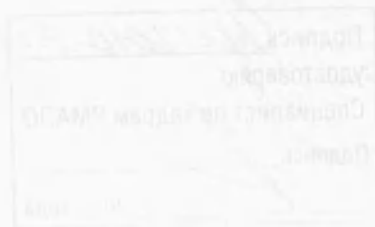
и пронумеровано

6 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения
IgG антител к диамидированным пептидам глиадина (анти-DGP IgG)

АЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-DGP IgG предназначен для количественного определения IgG аутоантител к DGP в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro* у пациентов с предполагаемым диагнозом целиакия.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Целиакия (синонимы: глютеновая болезнь, глютеновая энтеропатия, глютеночувствительная целиакия) – это энтеропатия, при которой развивается воспаление и атрофия ворсинок тонкого кишечника. В патогенезе этого заболевания лежит непереносимость глютена. Заболевание сопровождается аутоиммунным процессом, запускающимся и сохраняющимся у людей с генетической предрасположенностью при приеме пищи, содержащей глютен (пшеница, рожь, ячмень и т.д.) [1] [2].

Целиакия встречается у примерно 1% населения, в любом возрасте [3] [4], и часто остается недиагностированным из-за большого различия симптомов. Кроме типичных клинических проявлений целиакии, таких как признаки синдрома мальабсорбции (хроническая диарея, метеоризм, потеря веса и т.д.), с ней часто ассоциированы нетипичные заболевания или симптомы, такие как герпетический дерматит, диабет 1 типа, остеопороз, некоторые лимфомы, дефицит железа, хроническая усталость, невынашиваемость. Иногда симптомы плохо выражены или отсутствуют [5] [6].

Патогенез целиакии до конца еще не ясен. После всасывания глиадина (из глютена) диамидируется тканевая трансглутаминазой (tTG) в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, что приводит к замещению остатков глутамина остатками глутаминовой кислоты. Фрагменты глиадина (диамидированные пептиды глиадина) связываются с молекулами HLA антигенпрезентирующих клеток, где они распознаются соответствующими Т-хелперными клетками. В результате этого процесса развивается иммунный ответ и образуются антитела к DGP, дополнительно к антителам, образующимся к tTG [7] [8]. Определение этих антител (IgA, IgG) может быть использовано, совместно с клиническими наблюдениями и другими лабораторными исследованиями для постановки диагноза целиакии.

ИФА методы, основанные на использовании нативного белка в качестве антигена для выявления антител к глиадину, обладают не очень высокой диагностической точностью. В отличие от других методов, данный метод основан на использовании эпитопов диамидированных пептидов глиадина (DGP) в качестве антигена, что обеспечило данному методу исключительно высокую диагностическую значимость [9] [10].

В сыворотке больных целиакией выявляются оба класса антител, и IgA, и IgG к глиадину [11]. Так как у значительной части больных наблюдается дефицит IgA [12], чувствительный скрининг групп риска включает определение и IgA, и IgG антител. С помощью определения IgA антител можно оценить активность заболевания и мониторировать соблюдение безглютеновой диеты [13].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лунки планшета покрыты диамидированными пептидами глиадина. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке или плазме, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.

контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

Все компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, содержащихся в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать осторожность при лабораторной практике (см. 8., 9., 10.).

Все компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промойте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.

При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

В местах, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.

Избегайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызвать спонтанное возгорание.

Следуйте руководству по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или сыровотки.

При обращении с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

СТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенными DGP. Готов для использования.	1
Комбинированные калибраторы (A-F) с антителами к -DGP класса IgG в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)) содержащие: 6 флаконов 0, 6,3, 12,5, 25, 50, 100 Ед/мл. Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к DGP в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w)), желтый, концентрат (5x) . Готов для использования.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата PBS, PROCLIN 300 $< 0,5\%$ (v/v) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8 °C.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течений 30 дней при хранении при 2-8 °C.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

берите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
12. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К), калибраторов (С) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения одного класса антител добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки.

	1	2	3	4	5	6
a	SA	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от А до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
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			

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
 Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.
 Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
 Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.
 Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений антител к DGP с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к DGP [Ед/мл]
нормальный уровень	<10
повышенный уровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к DGP. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к DGP были разведены буфером для образцов и проанализированы. Результаты анализа были линейны во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 2 различных опытов по 16 определений каждого из трех образцов:

Анти-DGP			Анти-DGP		
Внутри серии			между сериями		
Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]	Образец No	Среднее [Ед/мл]	CV [%]
1	22.1	3.0	1	23.3	8.1
2	39.9	3.8	2	40.1	4.7
3	69.2	4.3	3	71.3	7.0

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к DGP класса IgG – 0.5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенными DGP. Данный набор специфичен для аутоантител к DGP.

Калибровка

Так как не существует международного стандарта анти-DGP антител, данный метод прокалиброван в условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-DGP IgG может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз	до 1000 мг/дл
Липемия	до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин	до 40 мг/дл
Антикоагулянты	в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к DGP

1. Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

↓
Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

↓
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

2. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

↓
Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

↓
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

3. Добавьте 100 мкл раствора субстрата

↓
Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

4. Добавьте 100 мкл стоп-раствора

↓
Выдержите 5 минут

↓
Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011г.

Подпись *Долгов В.В.*
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО

Подпись _____

« » 20 ____ года

Всего прошито

и пронумеровано

5 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител (IgA или IgG) к диамидированным пептидам глиадина (анти-DGP Screen)

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод Anti-DGP IgG предназначен для количественного определения IgG аутоантител к DGP в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Набор предназначен только для диагностики *in vitro* у пациентов с предполагаемым диагнозом целиакия.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Целиакия (синонимы: глютенная болезнь, глютеновая энтеропатия, глютеночувствительная целиакия) – это энтеропатия, при которой развивается воспаление и атрофия ворсинок тонкого кишечника. В патогенезе этого заболевания лежит непереносимость глютена. Заболевание сопровождается аутоиммунным процессом, запускающимся и сохраняющимся у людей с генетической предрасположенностью при приеме пищи, содержащей глютен (пшеница, рожь, ячмень и т.д.) [1] [2].

Целиакия встречается у примерно 1% населения, в любом возрасте [3] [4], и часто остается недиагностированным из-за большого различия симптомов. Кроме типичных клинических проявлений целиакии, таких как признаки синдрома мальабсорбции (хроническая диарея, метеоризм, потеря веса и т.д.), с ней часто ассоциированы нетипичные заболевания или симптомы, такие как герпетический дерматит, диабет 1 типа, остеопороз, некоторые лимфомы, дефицит железа, хроническая усталость, невынашиваемость. Иногда симптомы плохо выражены или отсутствуют [5] [6].

Патогенез целиакии до конца еще не ясен. После всасывания глиадин (из глютена) диамидируется тканевой трансглутаминазой (tTG) в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, что приводит к замещению остатков глутамина остатками глутаминовой кислоты. Фрагменты глиадина (диамидированные пептиды глиадина) связываются с молекулами HLA антигенпрезентирующих клеток, где они распознаются соответствующими Т-хелперными клетками. В результате этого процесса развивается иммунный ответ и образуются антитела к DGP, дополнительно к антителам, образующимся к tTG [7] [8]. Определение этих антител (IgA, IgG) может быть использовано, совместно с клиническими наблюдениями и другими лабораторными исследованиями для постановки диагноза целиакии.

ИФА методы, основанные на использовании нативного белка в качестве антигена для выявления антител к глиадину, обладают не очень высокой диагностической точностью. В отличие от других методов, данный метод основан на использовании эпитопов диамидированных пептидов глиадина (DGP) в качестве антигена, что обеспечило данному методу исключительно высокую диагностическую значимость [9] [10].

В сыворотке больных целиакией выявляются оба класса антител, и IgA, и IgG к глиадину [11]. Как у значительной части больных наблюдается дефицит IgA [12], чувствительный скрининг риска включает определение и IgA, и IgG антител. С помощью определения IgA антител можно оценить активность заболевания и мониторировать соблюдение безглютеновой диеты [13].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лунки планшета покрыты диамидированными пептидами глиадина. Антитела к этому пептиду, присутствующие в разведенной сыворотке или плазме, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Peroксидаза хрена (HRP), конъюгированная антителами к IgG человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
 3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
 4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
 5. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов и буфер для промывок) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) является высоко токсичным веществом и реактивен в чистом виде. В концентрациях, присутствующих в наборе (0.09%), он не опасен. Несмотря на классификацию как не опасное вещество, рекомендуется соблюдать правила хорошей лабораторной практики (см. 8., 9., 10.).
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, тщательно промывайте водопроводную систему большим количеством воды, для разведения ниже активного уровня.
 8. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки
 9. Не пипетируйте ртом
 10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Соблюдайте руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.
- В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенными DGP. Готов для использования.	1
Комбинированные калибраторы (A-F) с антителами к -DGP класса IgG в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) содержащие: 6 флаконов 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 Ед/мл. Готовы для использования.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к DGP в фосфатно-белковом матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% (w/w)) (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы для использования.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% (w/w)), желтый, концентрат (5x). Готов для использования.	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

Хранение и стабильность

1. Храните набор при 2-8 °С.
2. Храните микропланшет запечатанным, в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не подвергайте реагенты нагреванию, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования.
5. Разведенный буфер для образцов и буфер для промывок стабильны в течении 30 дней при хранении при 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
- Вортекс
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Программное обеспечение для обработки результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

БОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не заменяйте компоненты набора реагентами из других лотов.
3. Все материалы должны достичь комнатной температуры (20-28 °C) перед тестированием.
4. Перед началом анализа подготовьте все реагенты и образцы. После начала процедуры анализа должны выполняться без остановок, для получения наиболее достоверных и точных результатов.
5. Выполняйте все шаги анализа только в полном соответствии с данной инструкцией.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Чтобы избежать перекрестной контаминации меняйте наконечники перед нанесением каждого образца и контроля.
9. Для достижения наиболее точных результатов очень важно тщательно промывать лунки микропланшета и удалить после промывки весь промывочный буфер из лунок.
10. Все инкубации должны проводиться строго в течение указанного времени.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны тестироваться при каждой постановке, также, как и образцы, для проверки качества используемых реагентов и выполняемого анализа.
12. Не используйте лунки микропланшета повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации, можно построить калибровочную кривую, для получения полуколичественных результатов для тестируемых образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

добавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

МЕТОДИКА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К), калибраторов (С) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения одного класса антител добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от А до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль; C2 – негативный контроль
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			
f	S C	C1	P3			
g	S D	C2	P4			
h	S D	C2	P4			

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При исследовании нормального диапазона значений антител к DGP с использованием данного теста у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к DGP [Ед/мл]
нормальный уровень	<10
повышенный уровень	≥10

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к DGP. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки с высокой концентрацией антител к DGP были разведены буфером для образцов и проанализированы. Результаты анализа были линейны во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 2 различных опытов по 16 определений каждого из трех образцов:

Анти-DGP

Анти-DGP

Внутри серии		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	22.1	3.0
2	39.9	3.8
3	69.2	4.3

между сериями		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	23.3	8.1
2	40.1	4.7
3	71.3	7.0

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к DGP класса IgG – 0.5 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенными DGP. Данный набор специфичен для аутоантител к DGP.

Калибровка

Так как не существует международного стандарта анти-DGP антител, данный метод прокалиброван в условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-DGP IgG может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

Интерференции

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемолиз до 1000 мг/дл
Липемия до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин до 40 мг/дл
Антикоагулянты в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к DGP

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов



Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре



Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

↓
Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

↓
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора субстрата

↓
Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

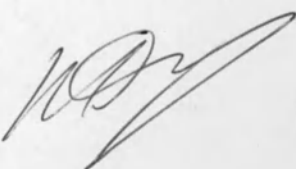
Добавьте 100 мкл стоп-раствора

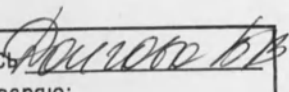
↓
Выдержите 5 минут

↓
Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»


д.м.н., профессор Долгов В.В.
«__» _____ 2011г.

Подпись 
удостоверяю:

Специалист по кадрам РМАПО

Подпись _____

20 ____ года



Всего прошито

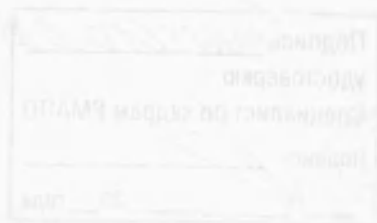
и пронумеровано

8 листов.

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к β 2-гликопротеину I, кардиолипину, фосфатидил серину, фосфатидил инозитолу, фосфатидиловой кислоте ThromboCombo IgG/IgM.

Назначение

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для количественного определения аутоантител классов IgG и/или IgM к β 2-гликопротеину I, кардиолипину (КЛ), фосфатидил серину (ФС), фосфатидил инозитолу (ФИ), фосфатидиловой кислоте (ФК) и к смеси 4 различных фосфолипидов с (ряд G) и без (ряд H) добавления β 2-гликопротеина I для изучения его роли. Набор предназначен для диагностики Системной красной волчанки.

ИСТОРИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Исследование антител к фосфолипидам началось в 1906 году с введением Вассерманом серологического теста на сифилис. В 1942 году обнаружена фосфолипидная природа антигена, названного кардиолипином. К 1950 году выяснилось, что многие люди обнаруживали положительный результат на сифилис без клинических проявлений заболевания. Данное явление было названо ложноположительным серологическим тестом на сифилис. В группе таких пациентов обнаружена высокая частота аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку и синдром Шегрена.

Наличие циркулирующего антикоагулянта у пациентов с системной красной волчанкой было впервые обнаружено в 1952 году и ассоциировано с повышенным риском пародоксального тромбоза в 1963 году. Термин "волчаночный антикоагулянт", введенный в 1972 году, не вполне корректен, так как чаще обнаруживается у пациентов без волчанки и ассоциирован более с тромбозом, чем с патологическим кровотечением.

В последнее время стало известно, что кофактором антикардиолипиновых антител является β 2-гликопротеин I. β 2-гликопротеин I (аполипопротеин H) представляет собой β 2-глобулин с молекулярной массой 50 килодальтон, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. Обнаружено, что β 2-гликопротеин I ингибирует внутренний путь свертывания, участвуя тем самым в регуляции свертывания крови. β 2-гликопротеин I in vivo ассоциирован с отрицательно заряженными частицами - анионными фосфолипидами, гепарином и липопротеинами. Участок связывания фосфолипидов находится в пятом домене молекулы.

Термином "антитела к фосфолипидам" обозначаются антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам, таким как кардиолипин, волчаночный антикоагулянт, фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота. Из этих соединений кардиолипин наиболее часто используется в качестве антигена в ИФА-тестах на антитела к фосфолипидам. Некоторые антисыворотки, реагирующие с ИФА-ячейками, покрытыми кардиолипином, могут реагировать с другими отрицательно заряженными фосфолипидами, такими как фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота.

Некоторые исследователи полагают, что использование фосфатидил-серина вместо кардиолипина в ИФА-тестах увеличивает специфичность диагностики. Эти антигены обычно редко используются, и их дополнительное применение может повысить клиническую чувствительность анализа образцов пациентов с предполагаемым анти-фосфолипидным синдромом, но, по всей вероятности, не может заменить определение антител к кардиолипину. Для анализа клинической

значимости частоты встречаемости различных антифосфолипидных антител была разработана тест-система ThromboCombo.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, в лунках которого сорбированы высоко очищенные β 2-гликопротеин I, кардиолипин (КЛ), фосфатидил серин (ФС), фосфатидил инозитол (ФИ), фосфатидиловая кислота (ФК). Если антитела к этим антигенам присутствуют в разведенных образцах сыворотки, то они связываются с иммобилизованным в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки и плазмы. Конъюгат антител к IgG и IgM человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из образцов сывороток пациентов, связавшихся с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуются комплексы конъюгат/антитело/антиген. Избыток конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизуетс с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора, при этом цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора 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 крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

Некоторые реагенты (контроли, Буфер образцов и Буферный Промывочный раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) – токсичное и взрывчатое в чистом виде вещество. В той концентрации, в которой азид содержится в реагентах набора, оно не представляет подобной опасности. Несмотря на это, мы рекомендуем строго придерживаться правил квалифицированной лабораторной практики (см. пп.8,9,10).

Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. Смывайте отходы большим количеством воды для разбавления компонентов ниже активного уровня. При работе с образцами и реагентами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

Не пипетируйте ртом.

В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках для анализа контроля и/или пулов сыворотки. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание. Контролируйте качество в соответствии с национальными руководствами по контролю с использованием контролей из набора и пулированных сывороток. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами сыворотки и плазмы соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых:	1

А: Референсный антиген В: β2-гликопротеин I (β2-ГП I) С: Кардиолипин (с β2-ГП I) Д: Фосфатидил серин (с β2-ГП I) Е: Фосфатидил инозитол (с β2-ГП I) Ф: Фосфатидиловая кислота (с β2-ГП I) Г: Смесь антигенов: см. ряды С-Ф (с β2-ГП I) Н: Смесь антигенов: см. ряды С-Ф (без β2-ГП I) Готов для использования.	
Комбинированные калибраторы классов с антителами IgG и IgM в фосфатно-белковом матриксе (ФСБ, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{в/о})$), содержащие: Г: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 Е/мл и М: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 Е/мл Готовы для использования.	1 набор, 6 флаконов 1,5 мл каждый
Буфер образцов, желтый (Трис, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{в/о})$), концентрат (5х)	1 флакон, 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержит поликлональные кроличьи IgG-IgG антитела к человеческому тиреоглобулину, меченые пероксидазой хрена (ФСБ, Проклин $300 < 0,5\%(\text{о/о})$). Готов для использования.	1 флакон, 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержит поликлональные кроличьи IgG-IgM антитела к человеческому тиреоглобулину, меченые пероксидазой хрена (ФСБ, Проклин $300 < 0,5\%(\text{о/о})$). Готов для использования.	1 флакон, 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов для использования.	1 флакон, 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов для использования.	1 флакон, 15 мл
Буферный промывочный раствор (ФСБ, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{в/о})$), концентрат (50х)	1 флакон, 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

Хранить при 2 - 8 °С.

Неиспользованные стрипы микропланшета должны храниться при 2 - 8 °С в хорошо закрытом пакете с осушителем.

Компоненты стабильны до срока годности набора.

Разбавленный Промывочный буфер стабилен, по крайней мере, 30 дней при 2 - 8 °С.,

Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °С

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
 - Многоканальный диспенсер
 - Вортекс
 - Пипетки на 50, 100 и 1000 μ л
 - Таймер
 - программное обеспечение для ридера
- Приготовление реагентов
- дистиллированная вода

ный цилиндр на 1000 мл
 стиковый контейнер для хранения промывочного раствора

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

- Материал образца: сыворотка или плазма
- Объем образца: 50 мкл для одинарного определения
- Общее время инкубации: 135 минут при комнатной температуре (18 - 28 °C)
- Диапазон калибровки: 3 - 300 нг/мл
- Чувствительность: 1 нг/мл
- Хранение: охлаждение при 2 - 8 °C
- Срок годности: 12 месяцев с момента изготовления или до указанного на этикетках срока годности
- Формат набора: 96 тестов

БОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Соберите кровь обычной венопункцией в вакутейнеры, избегая гемолиза
 Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования густка.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A. референс-антиген	S A	S B	S C	S D	S E	S F	S A	S B	S C	S D	S E	S F
B. β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
C. КЛ+β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
D. ФС+β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
E. ФИ+β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
F. ФК+β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
G. смесь+β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
H. смесь без β2-ГП I	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P 6
SA, SB...SF - Калибраторы от A до F, P1,P2...- Образцы пациентов 1,2,...												

Сыворотка не должна содержать никаких примесей или быть гемолизированной. Лучше избегать гемолиза и липемии, хотя они не оказывают существенного влияния на этот анализ.
 Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8°C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения до шести месяцев образцы следует заморозить до -20°C. Д
 Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов, т.к. это может привести к потере активности.
 Использование инактивированных теплом сывороток не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Не заменяйте компоненты набора компонентами из других лотов
- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°C).
- Подготовьте все необходимые реагенты и материалы заранее. Начав работу, не прерывайтесь, это принципиально для получения достоверных и воспроизводимых результатов.

- Выполняйте все этапы только строго согласно указанной последовательности.
- Всегда используйте свежее разведение образцов
- Пипетируйте все реагенты прямо на дно ячеек.
- Избегайте контаминации и переноса реагентов, используя для этого одноразовые наконечники для раскапывания образцов и реагентов и контролируя реакцию с помощью контролей.
- Принципиально тщательно промывать ячейки и полностью удалять оставшиеся после промывки капли.
- Строго соблюдайте сроки инкубации.
- Контрольные образцы включайте в каждую постановку для проверки работы реагентов и правильности выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 101 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 1000 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения антител одного класса добавьте в ячейки 100 мкл калибраторов и 7х100 мкл предварительно разбавленных образцов пациентов.
Для определения обоих классов (IgG- и IgM-антител) калибраторы и образцы должны пипетироваться для двух опытов.
3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28°C).
4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку (анти-человеческие IgG или анти-IgM).
6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

Набор полностью пригоден для использования в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

достоверен при условии, что ОП контролей при 450 нм полностью соответствуют диапазонам, данным в сертификате контроля качества к набору, вложенном в набор. Если условия не соблюдаются, анализ необходимо повторить.

Интерпретация результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими осями для оптической плотности и концентрации.

Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого стандарта. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровую бумагу и отложите оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

Интерпретация результатов

В исследовании нормального диапазона значений с использованием теста ThromboCombo у здоровых добровольцев получены следующие значения:

	IgG [Ед/мл]	IgM [Ед/мл]
нормальный уровень	<10	<10
повышенный уровень	≥10	≥10

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями тиреоглобулина были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. Результаты показали линейность во всем измеряемом диапазоне.

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенными кардиолипином, фосфатидил-серином, фосфатидиловой кислотой, фосфатидил-инозитолом, смесью этих фосфолипидов и человеческим β2-гликопротеином I.

Специальная технология покрытия, разработанная производителем, гарантирует, что после иммобилизации на твердой фазе фосфолипиды имеют естественную иммуногенную структуру. Набор специфичен для антител к соответствующим фосфолипидам или комплексу отрицательно заряженных фосфолипидов и β2-гликопротеина I.

Перекрестных реакций к анти-ДНК антителам и антителам, встречающимся при сифилисе, не наблюдалось.

Калибровка

Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Луисвилль, США, так как других международных стандартов не существует.

Ограничения метода

Набор предназначен только как дополнительный метод для диагностики. Клинический диагноз не может основываться на результатах единственного теста, но может быть поставлен врачом только по совокупности клинических и лабораторных данных.

Интерференция

Не наблюдались перекрестные реакции в следующих условиях: сыворотка с гемолизом до 1000 мг/дл, липемией до 3 г/дл триглицеридов, билирубином до 4- мг/дл. Не наблюдались никакие интерферирующие влияния антикоагулянтов. Однако, по практическим причинам не рекомендуется использование гемолизированных или липемических образцов.

Добавить
Калибраторы
100 μ л

или

Образцы пациентов
7 x 100 μ л

☐

инкубировать 30 минут при комнатной температуре

добавить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

инкубировать 15 минут при комнатной температуре

добавить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

☐

Выдержать 5 минут

☐

Считать при 450 nm

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Подпись	
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись	
"__" ____	20 ____ года

Всего прошито
и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к аннексину V классов IgG и IgM Anti-Annexin V.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC Anti-ANNEXIN V предназначен для количественного определения аутоантител классов G и M к аннексину V в сыворотке или плазме человека. Этот метод предназначен для диагностики in vitro риска тромбоза и привычной потери плода.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аутоиммунные антитела к антифосфолипид-связанным белкам ассоциированы с рядом тромбоэмболических осложнений, как артериальных, так и венозных, включая привычную потерю плода и тромбоцитопению (3). Патологические механизмы антифосфолипидного синдрома (АФЛ) ещё полностью не выяснены (10).

Аннексин V, также известный как плацентарный антикоагулянтный протеин (РАР I) (8), не только принадлежит семейству кальций-зависимых белков, связывающих фосфолипиды (5), но также является возможным сосудистым антикоагулянтным протеином (9).

Аннексин V необходим для поддержания плацентарной целостности (8) и может оказывать тромборегуляторный эффект в материнско-фетальном взаимодействии, как показано в модели на мышах (14).

Предполагают, что связывание антител к аннексину V с мембраной, покрытой аннексином V в ворсинках плаценты приводит к экспозиции на мембране анионных прокоагулянтных фосфолипидов. Анионные прокоагулянтные фосфолипиды, как известно, усиливают процессы коагуляции крови в плацентарных сосудах, и могут быть важным провоцирующим фактором тромбоза и привычной потери плода при АФЛ (9).

Антитела к аннексину V не только высоко специфичны для АФЛ, но также повышены у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) (4, 6).

Считают, что антитела к аннексину V имеют значение в развитии ревматоидного артрита (2, 11).

У пациентов с положительным результатом на наличие антител к аннексину V найдена очень высокая частота артериального или венозного тромбоза (12).

При наличии этих антител очень высок риск привычного выкидыша у пациенток с СКВ (7).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным человеческим рекомбинантным аннексином V. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG и IgM человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением раствора фосфорной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность

ния прямо пропорциональна концентрации IgG и IgM антител, присутствовавших в исходном

УПАКОВКА И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

Компоненты набора 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 крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.

Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

- Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для разбавления образцов и промывочный буферный раствор) содержат азид натрия в качестве консервантов. Азид натрия (NaN_3) высоко токсичное и активное в чистом виде вещество. В той концентрации, в которой он находится в компонентах набора, он не опасен. Несмотря на это производители набора настоятельно рекомендуют с осторожностью использовать набор (пп 7,8,9)
- Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При смыве в канализацию рекомендуется разбавлять отходы большим количеством воды для снижения активного уровня.
- Во время работы пользуйтесь одноразовыми перчатками и тщательно мойте руки после работы.
- Не отбирайте образцы ртом
- В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить и пользоваться косметикой.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях для использования контролей и/или пулов сыворотки. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови следуйте локальным юридическим руководствам.

МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых человеческим аннексином. Готов к использованию.	1
Комбинированные калибраторы с антителами к аннексину классов IgG и IgM в сывороточно/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), содержащие: 6 флаконов IgG и IgM: 0; 6.3; 12; 5 25; 50, 100 Ед/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к аннексину в сывороточно/буферном матриксе (фосфатно-солевой буфер, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$) Контроль 1: положительный на IgG-антитела Контроль 2: положительный на IgM-антитела Контроль 3: отрицательный на IgG- и IgM-антитела. Готовы к использованию.	3 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов (Tris, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{w/w})$), желтый, концентрат (5x).	1 флакон 20 мл

раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, CLIN 300<0,5%(v/v)) (светло-красный), содержащий клональные кроличьи античеловеческие IgG антитела, активные пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор ферментного конъюгата (фосфатно-солевой буфер, CLIN 300<0,5%(v/v)) (светло-красный), содержащий клональные кроличьи античеловеческие IgM антитела, активные пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
оп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
щелочной промывочный раствор (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, 0,1%(w/w)), концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ и стабильность РЕАГЕНТОВ

- Хранить при 2 - 8 °С
- Ячейки микропланшета хранятся в пакете с осушителем
- Компоненты набора стабильны до срока годности, указанного на этикетках.
- Беречь реагенты от воздействия тепла, солнца и яркого света при хранении и использовании.
- Буфер для образцов и промывочного буфера в разбавленном виде стабильны, по крайней мере, 30 дней при хранении при 2 - 8 °С

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер
- Лабораторный таймер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Вortex
- программное обеспечение для ридера

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Соберите образец цельной крови стандартной венопункцией, избегая гемолиза.
- Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием
- Избегайте гемолиза, липемии или микробиологического загрязнения сыворотки
- Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения до шести месяцев образцы следует заморозить при -20°C.
- Для предотвращения повторных циклов замораживания-оттаивания (это может привести к потере активности антител) следует приготовить аликвоты образцов.
- Все пробы сыворотки и плазмы должны быть разбавлены 1:100 буфером для образцов. Следовательно, 10 мкл образца могут быть разбавлены 1000 мкл буфера.
- Использование для анализа инактивированной нагреванием сыворотки не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ по выполнению анализа

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.

- Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28°C).
- Подготовьте все реагенты и образцы перед началом работы. Начав работать, выполняйте все шаги анализа без задержек для получения надежных и воспроизводимых результатов.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеразбавленные образцы.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Избегайте контаминации переносом образца в соседние ячейки – используйте одноразовые наконечники для каждого образца и реагента.
- Качественная промывка принципиальна для результата анализа, удаляйте оставшиеся капли полностью после промывки.
- Точно соблюдайте длительность инкубаций
- Контрольные образцы или пулированные сыворотки анализируйте как неизвестные для проверки работы реагентов и выполнения анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Используйте эти значения для построения калибровочной кривой, если хотите рассчитать результаты полуколичественно

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл (20 мл концентрата и 80 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления.

Приготовление образцов

Разбавьте все пробы пациентов в 100 раз буфером для образцов перед использованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера образцов в полистирольной пробирке. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.

2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
a	S A	SE	P1	P5		SA-SF - стандарты от A до F; P1, P2...- образцы пациентов 1, 2 ...; C1 – позитивный контроль;
b	S A	SE	P1	P5		
c	S B	SF	P2	P..		
d	S B	SF	P2	P..		
e	S C	C1	P3			

f	S C	C1	P3		
g	S D	C2	P4		
h	S D	C2	P4		

- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (18-28 °C).
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
9. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
10. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется фотометрическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут.
- Считайте оптическую плотность за это время.
- Интерпретация РЕЗУЛЬТАТОВ**

Контроль качества

Тест считается валидным при условии, что измеренные величины оптической плотности при 450 нм отрицательного и положительного контролей согласуются с диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, вложенном в набор. Если критерии не выполняются, результаты анализа считаются недостоверными, и анализ необходимо повторить.

Расчет результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации и log-log координаты.

Для ручного расчета рекомендуется линейно-логарифмическая миллиметровая бумага.

Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровую бумагу и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Таблица, приведенная ниже - типичные результаты, полученные на этом наборе при определении антител класса IgG и IgM к аннексину V. Данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для расчета результатов других тестов.

Стандарты (С)									
No	Лунка	ОП 1	ОП 2	Ср едн ее	Ко нц 1 яч.	Ко нц 2 яч.	Ср едн ее	Заяв л. Кон ц.	С V %
ST A	A 1/B 1	0,07 6	0,0 74	0,0 75	0,0 9	0,0 9	0,0 9	0,0	1, 9
ST B	C 1/D 1	0,28 6	0,2 88	0,2 87	5,5	5,6	5,6	6,3	0, 5
ST C	E 1/F 1	0,61 0	0,6 29	0,6 20	12, 0	12, 4	12, 2	12,5	2, 1

G 1/H	1,19	1,2	1,2	25,	26,	26,	25,0	1,
	9	23	11	8	5	2		4
A 2/B	1,80	1,7	1,7	49,	46,	47,	50,0	2,
	3	43	73	3	2	7		4
C 2/D	2,38	2,3	2,3	109	98,	103	100,	1,
	1	18	50	,8	0	,9	0	9

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В исследовании нормального диапазона значений антител к аннексину V с использованием данного метода у здоровых доноров получены следующие значения:

	Антитела к аннексину V IgG и IgM [Ед/мл]
Нормальный уровень	< 5
Повышенный уровень	5 - 8
Положительный	≥ 8

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к аннексину V. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. Анализ был линеен во всем диапазоне измерения.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 6 различных опытов по 8 определений каждого образца:

Анти-аннексин V			Анти-аннексин V		
Внутри серии			Между сериями		
Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]	Обр а-зец No	Сред нее [Ед/мл]	CV [%]
1	11	6,7	1	9	4,1
2	27	3,8	2	23	4,2
3	67	4,2	3	64	5,7

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к аннексину классов IgG и IgM – 1,0 Ед/мл.

Специфичность

опланшет покрыт высокоочищенным человеческим рекомбинантным аннексином V. Специальная технология нанесения антигенов в ячейки гарантирует нативную иммуногенную структуру аннексина V после иммобилизации на твердой фазе. Данный набор специфичен для аутоантител к аннексину V.

Набор реагентов

Набор реагентов, пока не появится международный референс-стандарт для антител к аннексину, используется в относительных условных единицах.

Ограничения метода

Набор следует использовать как дополнительный диагностический метод, но он не должен использоваться как основной и единственный. Диагностика не может основываться на результате единственного теста, такой результат должен оцениваться клиницистами только в совокупности с информацией, полученной от других клинических и лабораторных исследований.

Интерференция

Не наблюдалась интерференция для следующих случаев:

Гемоглобин	до 1000 мг/дл
Липемия	до 3 г/дл триглицеридов
Билирубин	до 40 мг/дл
Антикоагулянты	в принятых концентрациях

Однако на практике рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемичных образцов.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Добавить
100 μ л
микрокапсул

Контроли
100 μ л контролей или проб
пациента

- ☐ Инкубировать 30 минут при комнатной температуре
- ☐ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора ферментного
конъюгата

- ☐ Инкубировать 15 минут при комнатной температуре
- ☐ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л раствора субстрата ТМБ

- ☐ Инкубировать 15 минут при комнатной температуре

Добавить 100 μ л стоп-раствора

- ☐ Выдержать 5 минут и считать при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения антител к внутреннему фактору Anti-Intrinsic Factor

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения антител класса IgG к внутреннему фактору методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* в целях диагностики пернициозной анемии.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Болезнь Бирмера или пернициозная анемия разновидность анемии, наиболее частой причиной развития которой является дефицит витамина В₁₂ в организме в западной популяции, при которой наблюдаются классические признаки мегалобластной анемии (т.е. морфологические и функциональные изменения клеток крови и клеток-предшественников костного мозга, связанных со снижением синтеза ДНК) [1, 2, 3]. Она характеризуется дефектом слизистой желудка, при котором снижен синтез внутреннего фактора и выявляются антитела к париетальным клеткам желудка или к внутреннему фактору. Внутренний фактор человека – это гликопротеин, который синтезируется исключительно париетальными клетками желудка. Он играет ключевую роль в абсорбции и транспорте витамина В₁₂ в тонком кишечнике [4]. Существуют два типа аутоантител к внутреннему фактору [5]. Антитела типа I блокируют сайт связывания кобаламина на молекуле внутреннего фактора, препятствуя захвату витамина. Антитела типа II блокируют другой домен молекулы внутреннего фактора, который вовлечен в связывание комплекса внутренний фактор/кобаламин с подвздошными рецепторами. Оба типа антител обладают схожим патологическим эффектом, т.е. препятствуют ресорбции кобаламина подвздошными рецепторами. Аутоантитела к внутреннему фактору обнаруживаются у больных пернициозной анемией в 50 - 70% случаев и они очень специфичны именно для болезни Бирмера, не существует опубликованных данных об обнаружении положительных результатов у здоровых людей контрольной группы [6]. Набор ORGENTEC Anti-Intrinsic Factor ELISA определяет оба типа аутоантител, таким образом является полезным инструментом для дифференциальной диагностики пернициозной анемии и других случаев мальабсорбции витамина В₁₂.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, в лунках которого сорбирован рекомбинантный внутренний фактор. Присутствующие в образцах антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора, при этом Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого

ния определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце.

ИНСТРУКЦИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

Используйте компоненты наборов из различных лотов.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы и одобрены FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с образцами и образцами мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно промойте водой с мылом.

Раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) 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 (см. 8., 9., 10).

Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.

8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

9. Не отбирайте образцы ртом

10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых рекомбинантным внутренним фактором.	1
Стандарты с антителами к внутреннему фактору (A-F) в сывороточно/буферном (PBS/BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 Ед/мл. Готовы к использованию.	6 флаконов 1,5 мл каждый
Контроли антител к внутреннему фактору в сывороточно-буферном (PBS/BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию.	2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN_3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готовы к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл

ор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
промывочный раствор, концентрат (50х)	1 флакон 20 мл

НИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами света, не позволяйте реагентам нагреваться. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
 Бюретка
 Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл
 Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л
 Лабораторный таймер
 Программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей

Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.

Необходимо соблюдать время всех инкубаций

Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.

Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. С использованием этих концентраций может быть построена калибровочная кривая и проведена полуколичественная оценка образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разбавьте все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов в дублях.
 2. Добавьте в ячейки по 100 мкл соответствующих стандартов, контролей и предварительно разбавленных образцов сыворотки или плазмы пациентов.
 3. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-28 °C).
 4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
 6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.
 8. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.
 9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
 10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
 11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.
- Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-Intrinsic Factor ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

ЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и аппроксимации сплайнами.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность стандартов по результатам измерения в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

Пример расчетов

Стандарты									
No	Позиция	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	декл. конц.	CV %
ST 1	A1 / B1	0.063	0.076	0.069	<Min	0.2	0.2	0.001	12.23
ST 2	C1 / D1	0.185	0.197	0.191	11.0	12.1	12.1	1205	4.44
ST 3	E1 / F1	0.361	0.412	0.387	25.8	30.0	30.0	25	9.33
ST 4	G1 / H1	0.599	0.599	0.599	45.7	45.7	45.7	50	0
ST 5	A2 / B2	1.202	1.222	1.212	105.5	106.7	106.7	100	1.17
ST 6	C2 / D2	1.806	1.804	1.805	194.7	194.7	194.7	200	0.08

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании нормального диапазона значений антител к внутреннему фактору в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

IgG [Ед/мл]

норма: < 6

повышенные значения: ≥ 6

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии антител к гистонам.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Статистика для коэффициентов вариации (CV) была рассчитана для каждого из трех образцов в 9 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии, воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 3 различных постановок по 24 определения каждого образца:

Внутри серии

Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	92,1	3,3
2	61,5	4,5
3	49,9	3,2

Между сериями		
Образец No	Среднее x [Ед/мл]	CV [%]
1	103,2	3,8
2	67,4	3,9
3	49,1	5,6

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к внутреннему фактору составляет 1 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт рекомбинантным внутренним фактором. Тест специфичен только по отношению к аутоантителам к внутреннему фактору.

КАЛИБРОВКА

Поскольку не существует международно признанного стандарта аутоантител к внутреннему фактору, тест-система прокалибрована в относительных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-Intrinsic Factor ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры при диагностике пернициозной анемии, но сама по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,
 ЗАО "БиоХимМак"
 тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
 факс (095) 939-09-97
 E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Антитела к внутреннему фактору

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

Промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промойте промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промойте промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Подпись _____

удостоверяю:

Специалист по кадр

Подпись _____

« ____ » _____



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
Liver-9-Line – диагностика аутоиммунных заболеваний печени (антитела к антигенам печени).*

НАЗНАЧЕНИЕ

Liver-9-Line - набор, основанный на методе иммуноблота на мембране, для полуколичественного определения митохондриальных антител M2 подтипа (АМА-M2), антител к растворимому ядерному фактору (Sp100), антител к интегральному мембранному гликопротеину (gp210), антител к растворимым антигенам печени (SLA/LP), антител к микросомам (антиген тип I) печени и почек (LKM-1) и цитозольному антигену (антиген тип I) печени (LC1). Кроме того, данный метод выявляет аутоантитела к актину, десмину и миозину, трем различным антигенам гладкой мускулатуры (SMA). Liver-7-Line

Метод предназначен только для диагностики in vitro, могут быть исследованы образцы сыворотки или плазмы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Аутоиммунный гепатит (АИГ) это хроническое заболевание печени неясной этиологии. АИГ встречается очень редко (приблизительно от 50 до 200 больных на 1 миллион). Типичными для данного заболевания являются повышенный уровень трансаминазы, гипергаммаглобулинемия и повышенные титры антиядерных антител (ANA) и/или антител к гладкой мускулатуре (SMA). Гистологически выявляются признаки перипортального гепатита и инфильтрация портальной зоны лимфоидными клетками.

Заболевание встречается во всех возрастных группах, как у мужчин, так и у женщин, хотя женщины болеют чаще. При отсутствии лечения это заболевание прогрессирует до цирроза и/или варикоза вен пищевода. В этом случае смертность высокая. АИГ часто развивается бессимптомно.

Пациенты отмечают тошноту, постоянную усталость и боль в суставах и мышцах. Также могут присутствовать симптомы хронического заболевания печени, вплоть до и включая цирроз печени.

У большей части пациентов это заболевание часто диагностируется на бессимптомной стадии, в процессе обследования при увеличенном объеме печени. Так как прогноз значительно улучшается при своевременном лечении, то большое значение имеет ранняя диагностика аутоиммунного гепатита.

Основываясь на различии выявляемых аутоантител, различают тип I АИГ (АИГ-1) и тип 2 АИГ (АИГ-2). В то время как АИГ-1 встречается во всех возрастных группах, АИГ-2 обычно диагностируется в молодом возрасте и у детей. АИГ-2 составляет только небольшую часть всех случаев АИГ, но очень быстро прогрессирует.

Метод Liver-7-Line ORGENTEC представляет собой иммуноблот, и предназначен для серологического исследования с целью выявления аутоиммунного гепатита (АИГ). Одновременное определение аутоантител к семи различным антигенам делает возможной дифференциальную диагностику АИГ и исключение других заболеваний печени.

АМА-M2

Антимитохондриальные антитела (АМА) это гетерогенная группа аутоантител, направленных к различным белкам внутренней и внешней сторон митохондриальной мембраны. АМА подтипа M2 направлены к эпитопам комплекса пируватдегидрогеназы. Высокая чувствительность и специфичность аутоантител M2 делает их прекрасным инструментом для выявления первичного билиарного цирроза (РБС).

А определяются в 90 - 95% случаев у больных РВС; выявление значительно повышенного А (>1:40 методом непрямой иммунофлуоресценции) это достоверный признак РВС. АМА определяются у примерно 25 % больных АИИ, хотя в этих случаях титры обычно низкие.

Антитела к Sp100

По многим данным, указывающих на то, что антитела к Sp100 (дающие четкое ядерное точечное окрашивание при выявлении методом ИФЛА) высоко специфичны (специфичность 97%) для хронического билиарного цирроза (РВС), и они выявляются у 31% пациентов с РВС. Кроме того, Sp100 выявляется практически у каждого второго (48%) АМА-отрицательного пациента с клинически и гистологически подтвержденным РВС. По этой причине признано, что Sp100 представляет собой дополнительный маркер, в дополнение к АМА.

Таким образом, одновременное определение АМА и Sp100 высоко специфично для выявления РВС. Наоборот, при аутоиммунном гепатите (АИИ) 1, 2 и 3 типов, или при первичном склерозирующем гепатите (PSC), антитела к Sp100 выявляются крайне редко. Кроме того, антитела к Sp100 могут обнаруживаться при ревматоидном артрите (3%), системной волчанке (до 10%), системной склеродермии и у больных с синдромом Шегрена (2%).

Антитела к gp210

Известно, что антитела к gp210 (дающие четкое окрашивание ядерной мембраны при выявлении методом ИФЛА) высоко специфичны для РВС и определяются у 21-41% больных РВС. Кроме того, в 47% АМА-отрицательных и клинически подтвержденных случаев РВС наблюдаются антитела к gp210. Специфичность достигает 99,5%, при аутоиммунных гепатитах, ревматоидном артрите, миозите или синдроме Шегрена антитела к gp210 наблюдаются крайне редко. Кроме того, антитела к gp210 ассоциированы с внепеченочной манифестацией, например, с артритом, и плохим прогнозом течения заболевания РВС.

Антитела к SLA/LP

Антитела к растворимому антигену печени (SLA/LP) это высоко специфичный маркер АИИ-1. Аутоантиген-мишень – цитозольный белок с молекулярной массой 50 кДа, возможно, относится к рибонуклеопротеидному комплексу.

Антитела к LKM-1

Серологическим маркером АИИ-2 являются антитела к микросомам (1 типа) печени и почек. Аутоантиген-мишень – цитохром P450 2D6 (CYP2D6). Антитела к LKM-1 также выявляются у до 7% пациентов с хроническим гепатитом C3, включая дополнительный эпитоп CYP2D64.

Антитела к LC-1

Антитела к цитозольному антигену (1 типа) печени (LC-1) являются специфическим маркером и выявляются у до 50 % больных АИИ-2. Анти-LC-1 обнаруживаются у примерно половины всех пациентов, у которых присутствуют анти-LKM-1 антитела.

В отличие от анти-LKM-1, титр антител к LC-1 коррелирует с активностью заболевания.

Показано, что анти-LC-1 единственный серологический маркер, выявляемый у 10 % больных АИИ. Аутоантиген-мишень антител к LC-1 – фермент формиминотрансфераза циклодеаминаза (FTCD).

Анти-SMAs

Анти-SMAs это антитела к гладкой мускулатуре. Они являются типичными маркерами АИИ-1. SMA антитела выявляются у 87 % больных АИИ, либо как единственный маркер заболевания, либо в сочетании с ANA1 (антиядерными антителами). Анти-SMAs могут быть направлены к микрофиламентам (F-актин или миозин) или к промежуточным филаментам (десмин) гладкой мускулатуры. В случаях 1 типа АИИ, преимущественно выявляются антитела к F-актину.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые антигены AMA-M2, SLA/LP, LKM, LC1, gp210, Sp100 и SMA иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной сыворотке или плазме, связываются с мембраной. При промывке с мембранных стрипов удаляются неспецифические компоненты сыворотки или плазмы. Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами к IgG человека, иммунологически выявляет связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке или плазме пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии

легоса конъюгата, гидролизуетея с образованием нерастворимого сине-фиолетового продукта. При промывке с мембранных стрипов удаляется не гидролизовавшийся субстрат. Интенсивность ивирования прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном де.

ЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- е реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- омпоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы одами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако, ни один метод не жет гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с агентами данного набора, содержащими компоненты человеческого происхождения, следует браться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат / р-нитро голубой тетразол хлорид. Если BCIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN₃) 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 (0.09%), он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, настоятельно рекомендуется следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).
6. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
8. Не пипетируйте ртом
9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 или 16 тестов
Нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами антигенов AMA-M2, SLA/LP, LKM, LC1, gp210, Sp100, F-актина, десмина и миозина. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию. Данный буфер специально разработан для набора Liver-9-Line и не может быть заменен буфером для образцов из других наборов для иммуоблотов.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, концентрат 50x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, NaN ₃ <0.1 % (w/w)) ферментного конъюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	1 флакон 20 мл
Раствор субстрата (BCIP/NBT). Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 5 мл
Предобработанные калибровочные нитроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуколичественного анализа. Готовы к использованию.	1 или 2

...сти для инкубации	1 или 2
...данных. Готовы к использованию.	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке.
Храните нитроцеллюлозные стрипы в хорошо запечатанном пластиковом контейнере, с осушителем.
Важно: Калибровочный стрип очень чувствителен к свету. Пожалуйста, храните его в темноте.
Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться во время работы или хранения.
Разведенные буфер для промывок стабилен при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления и до срока годности, указанного на этикетке.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Качающаяся платформа
- Пинцет
- Приготовление реагентов
- дистиллированная вода
- мерный цилиндр на 1000 мл

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С до 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Для избежания перекрестной контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
8. С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пинцета.
9. Необходимо точно соблюдать время всех инкубаций
10. Контрольные сыворотки или пулы должны всегда анализироваться совместно с остальными образцами, при тех же условиях, для проверки качества выполнения методики и реагентов.
11. Убедитесь, что на стрипе во время инкубации нет пузырьков воздуха. Наличие пузырьков может привести к неравномерному окрашиванию бендов и неправильной интерпретации результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для промывок

Влейте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера в дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным: при 2-8°C стабилен при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Используя пинцет, поместите стрип Liver-9-Line и добавьте по 1.0 мл буфера для образцов в каждую камеру инкубационной емкости. Аккуратно покачивайте в течение 5 минут для равномерного распределения.
- Внесите 10 мкл образца сыворотки пациента непосредственно в камеру (конечное разведение 1:101). Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
- Осторожно полностью удалите разведенную сыворотку со стрипов.
- Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
- Внесите по 1.0 мл ферментного конъюгата в каждую камеру. 7. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
- Осторожно полностью удалите ферментный конъюгат со стрипов.
- Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
- Внесите по 1 мл субстрата на каждый стрип.
- Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
- Удалите субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой, по 1.0 мл три раза по 5 минут каждый, для остановки реакции.
- Осторожно высушите стрипы (промокните) фильтровальной бумагой.
- Перед оценкой дайте стрипам высохнуть на воздухе.

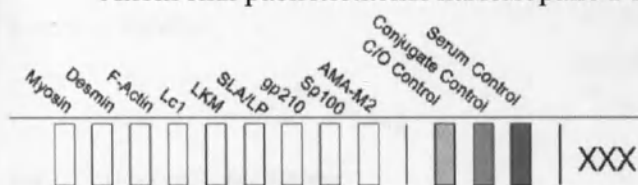
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если Контрольная сыворотка (первая линия), контроль конъюгата (вторая линия) и контроль дискриминационного уровня «Cut-Off» (третья линия) демонстрируют преобразование субстрата в виде образовавшихся бендов! Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

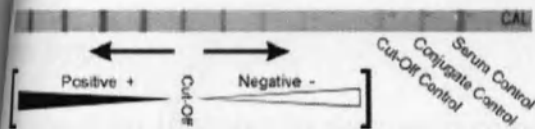
Интерпретация результатов

Антигены расположены на мембране в порядке, указанном на рисунке:



Стрип, инкубированный с образцом сыворотки пациента (тест-стрип) с проявившимися окрашенными бендами сравнивают с калибровочным стрипом:

- Сравните бенд контроля «Cut-Off» тест-стрипа с калибровочными бендами калибровочного стрипа для корректировки.
- Для полуколичественного определения сравните бенды на тест-стрипе с калибровочными бендами калибровочного стрипа, скорректированными по контролю «Cut-Off».



сказания по интерпретации результатов:

Этот полуколичественный метод определения специфических аутоантител в образцах сывороток пациентов позволяет различать отрицательный, пограничный, слабо положительный, положительный и слабо положительный результаты. Образцы с пограничными результатами должны быть протестированы еще раз этим или альтернативным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Специфичность

Набором Liver-9-Line протестировали образцы сывороток пациентов с известной специфичностью и доноров крови, используя обычную процедуру метода. Для всех доноров крови были получены отрицательные результаты для всех специфических антигенов.

Калибровка

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для метода иммуноблота Liver-9-Line оценивались с использованием внутренних контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известной специфичностью.

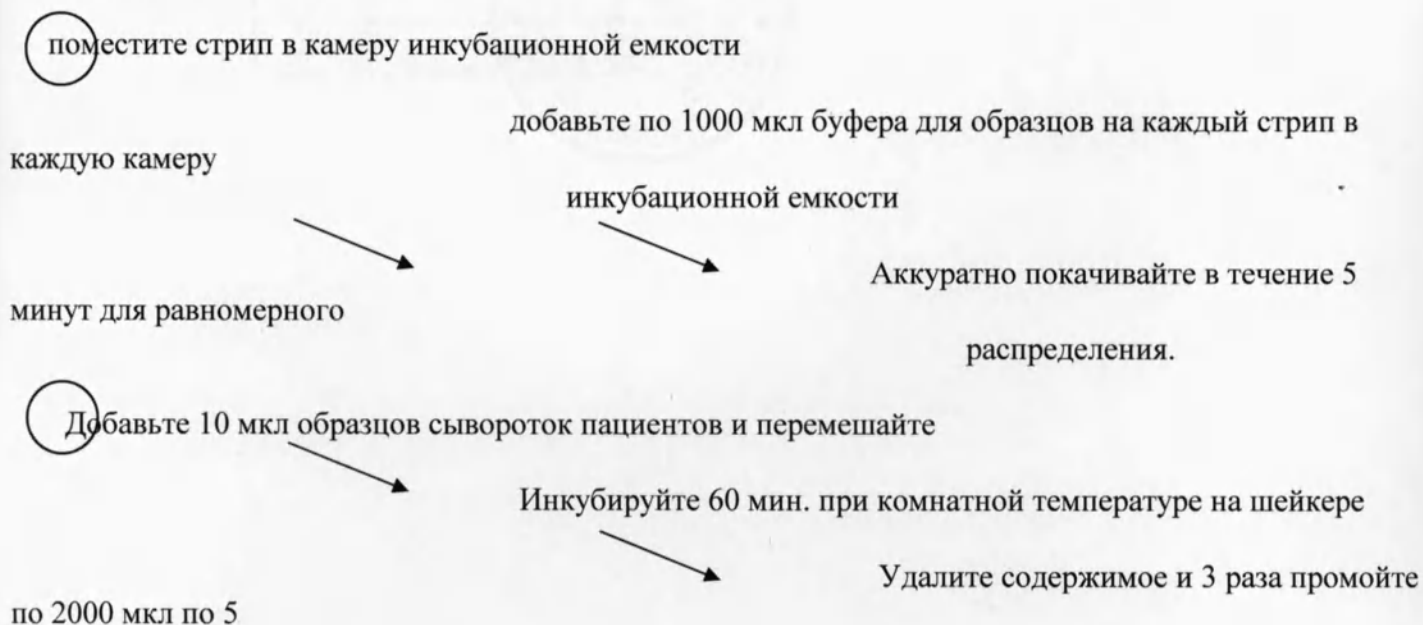
ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Liver-9-Line может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностикумом. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ



минут буфером для промывок.

те буфер.

Добавьте по 1000 мкл ферментного конъюгата на каждый стрип

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре на шейкере

Удалите содержимое и 3 раза промойте по 2000

минут буфером для промывок. Удалите буфер.

Добавьте по 1000 мкл субстрата на стрип

Инкубируйте 10 мин. при комнатной температуре на шейкере

Удалите содержимое и 3 раза промойте

минут дистиллированной водой.

фильтровальной бумагой.

после полного высыхания

по 1000 мкл по 5

Высушите стрипы

Оценивайте результаты только

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения Anti-CCP hs для высокочувствительного количественного определения антител к модифицированному цитруллинированному цитруллину.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор Anti-CCP предназначен для высокочувствительного количественного определения антител класса IgG к модифицированному цитруллинированному цитруллину методом прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики in vitro, и может быть использован при диагностике ревматоидного артрита.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Ревматоидный артрит (РА) одно из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний. Основной характеристикой РА является воспаление сустава, приводящее к его повреждению и потере функции. Ранняя диагностика РА и немедленное начало соответствующего лечения очень важны для предупреждения полного повреждения сустава. Диагностика РА в первую очередь основывается на клинической манифестации, до настоящего момента серологические исследования были ограничены определением аутоантител к ревматоидному фактору (RF). RF является чувствительным серологическим маркером РА, с умеренной специфичностью, около 70%. Во многих исследованиях было показано, что у RF-негативных пациентов определяются антитела к цитруллинированным аргининовым остаткам в белках филаментов.

Расщепление аргинина до цитруллина это процесс, катализируемый ферментом пептидил-аргинин дезиминазой (peptidylarginine deiminase, PAD), при котором аминокислота аргинин (Arg) преобразуется в цитруллин. В процессе модификации положительно заряженная NH₂ группа отщепляется с присоединением кислорода [4].

Набор ORGENTEC Anti-CCP ELISA обладает высокой чувствительностью и специфичностью к аутоантителам против модифицированного цитруллинированного цитруллина. Модифицированный цитруллинированный цитруллин постоянно обнаруживается в синовиальной ткани у пациентов с РА. Недавно были обнаружены выделение и модификация цитруллина макрофагами в зависимости от провоспалительных сигналов [12]. Титр антител к цитруллину у пациентов с РА строго коррелирует с показателем активности заболевания. (DAS).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, в лунках которого сорбирован модифицированный цитруллинированный цитруллин (CCP). Если антитела к этому антигену присутствуют в разведенных образцах сыворотки, то они связываются с иммобилизованным в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки и плазмы. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из образцов сывороток пациентов, связавшихся с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуются комплексы конъюгат/антитело/антиген. Избыток конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизует с

нем голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в топ-раствора, при этом цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность этого ния определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциона ации IgG в образце.

АНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

агенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.

еняйте компоненты наборов из различных лотов.

поненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы ами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg и ВИЧ. Однако, ни один метод не может тировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с нтами и образцами мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно мойте водой с мылом.

Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и ратитесь к врачу.

Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) одержат 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 (см. 8., 9., 10).

7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.

8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

9. Не отбирайте образцы ртом

10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых модифицированным цитруллинированным цитруллином (ССР). Готов к использованию	1
Комбинированные стандарты с IgG антителами к ССР (A-F) в сывороточно/буферном (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) матриксе, содержащие: IgG: 0; 20; 40; 100; 300 и 1000 Ед/мл Готовы к использованию	6 флаконов по 1,5 мл в каждом
Контроли антител к ССР в сывороточно-буферном (PBS, BSA, NaN_3 <0,1% (w/w)) матриксе, положительный (1) и отрицательный (2), концентрации указаны на вкладыше к набору. Готовы к использованию	2 флакона по 1,5 мл в каждом
Буфер для образцов (Tris, NaN_3 <0,1% (w/w)), желтый, концентрат 5x	1 флакон 20 мл

раствор (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), ферментного конъюгата (светло-желтый), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
промывочный буфер, (PBS, NaN ₃ <0,1% (w/w)), концентрат 50x	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс
- Многоканальные пипетки или дозаторы на 100 мкл

Пипетки на 10, 100 и 1000 μ л

Лабораторный таймер

программное обеспечение для анализа данных

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного буфера

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции

Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов

Наносите все образцы на дно лунок

Для избежания контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей

Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.

1. Необходимо соблюдать время всех инкубаций

1. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.

2. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного буфера

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным. Раствор стабилен при 2-8°C 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образцов

Разведите все образцы сывороток пациентов 1:100 буфером для образцов перед исследованием.

Например, смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке.

Хорошо перемешайте.

Контроли и стандарты готовы к использованию и не требуют разведения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов сывороток пациентов.

2. Добавьте в соответствующие ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов в дублях.

	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 от A до F

P1, P2...: образцы сывороток пациентов 1, 2 ...

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-28 °C).

4. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте каждую лунку 300 мкл промывочного буфера.

5. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.

6. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

7. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 300 мкл промывочного раствора.

Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку.

Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре.

Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется хроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Получившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Автоматизация: Тест-система ORGENTEC Anti-CCP ELISA может быть использована с открытым автоматизированным оборудованием для ELISA. Процедура теста, приведенная выше, применима как для ручного так и для автоматического исполнения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм Положительного контроля (1), Отрицательного контроля (2) и Калибраторов А и F полностью совпадают с соответствующими диапазонами, указанными в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой зависимости оптической плотности от концентрации в линейно-логарифмических координатах.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность для каждого стандарта по результатам измерений в дублях, и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные средние значения ОП стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании диапазона нормальных значений антител к ССР в сыворотках здоровых доноров получены следующие значения:

Анти- ССР IgG [Ед/мл]

норма: < 20

повышенные значения: ≥ 20

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон значений нормы и патологии для антител к ССР.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разведению сыворотки с высокой концентрацией антител были разведены буфером для образцов и проанализированы данным методом на содержание анти-ССР. Тестирование показало линейность метода во всем измеряемом диапазоне.

И-Р	образец	разведение	наблюдаемое [Ед/мл]	ожидаемое [Ед/мл]	н/о
G	1	1:100	569,3		
		1:200	287,8	284.7	101%
		1:400	149,2	142.3	105%
		1:800	73,9	71.2	104%
G	2	1:100	581,5		
		1:200	308,1	290.8	106%
		1:400	162,5	145.4	112%
		1:800	77,7	72.7	107%
gG	3	1:100	>max		
		1:200	754,7		
		1:400	379,0	377.4	100%
		1:800	191,4	188.7	101%

Воспроизводимость

Коэффициенты вариаций (CV) были подсчитаны для каждого из трех образцов по результатам 24 определений в одной постановке (для оценки воспроизводимости внутри серии).

Воспроизводимость между сериями юбыла рассчитана по результатам 5 различных постановок, в каждой из которых измеряли по 6 реплик для каждого образца:

Внутри серии			Между сериями		
обр азец No	средн ее [ед/м л]	CV [%]	образец No	среднее [ед/мл]	CV [%]
1	17	2.0	1	22	2.7
2	180	2.3	2	117	2.3
3	750	2.2	3	527	1.9

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к CCP данным методом составляет 1.0 Ед/мл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшет покрыт модифицированным цитруллинированным цитруллином. Данный тест специфичен только по отношению к аутоантителам к модифицированным цитруллинированным цитруллином.

Калибровка

Так как не существует международного референсного материала для Anti – CCP, система откалибрована в произвольных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест-система ORGENTEC Anti-CCP ELISA может быть использована как часть диагностической процедуры, но сама по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

МА ИНКУБАЦИИ
ителя к ССР

Добавьте в ячейки по 100 мкл стандартов, контролей и образцов

Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре

Удалите содержимое ячеек и трижды
промойте 300 мкл

Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

промойте 300 мкл

Удалите содержимое ячеек и трижды
промойте 300 мкл

Добавьте 100 мкл раствора субстрата

Инкубируйте 15 мин. при комнатной температуре

4. Добавьте 100 мкл стоп-раствора

Выдержите 5 минут

Считайте при 450 нм

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2011г.



ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для количественного определения
Иммуноферментный набор для количественного определения антител к базальной мембране
клубочков Anti-GBM*

АЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Anti-GBM основан на непрямом твердофазном иммуноферментном методе (ELISA) и предназначен для количественного измерения IgG класса аутоантител к базальной мембране клубочков в образцах плазмы и сыворотки. Метод предназначен только для овкедения анализа in vitro и может быть использован как дополнительный тест при диагностике гоиммунных нарушений почек (например при синдроме Гудпасчера).

Клиническая значимость

Первично, синдром Гудпасчера является аутоиммунным заболеванием почек. Американский патолог Эрнст Гудпасчер впервые в 1919 году описал клинический комплекс, состоящий из летальных легочных кровотечений и пролиферативного гломерулонефрита у молодых мужчин. В настоящее время данный синдром рассматривается как триада, состоящая из гломерулонефрита, легочных кровотечений и образования антител к базальной мембране клубочков.

Частота выявления синдрома Гудпасчера составляет 0.5-1 случай на 1 миллион жителей в год. Чаще всего страдают пациенты третьего и седьмого десятков лет жизни. Летальность среди пациентов в отсутствие лечения составляет 75-90% из-за развивающейся почечной или дыхательной недостаточности. Гистологически заболевание характеризуется линейным отложением иммуноглобулинов на базальной мембране клубочков, обнаруживаемым прямой иммунофлуоресценцией биоптата почек. Сегодня обнаружение циркулирующих аутоантител к С-терминальному концу α-3 цепи коллагена VI типа является диагностическим критерием заболевания.

Базальная мембрана клубочков формирует анатомический барьер между эпителием и соединительной тканью. Коллаген VI типа, обнаруживаемый только в базальной мембране клубочков, формирует матрикс, в который интегрированы другие молекулы (ламинин, энтактин). Три из шести α-цепей (полипептидов, состоящих более чем из 1650 аминокислотных остатков) образуют тройную спираль и характеризуют структурную субъединицу коллагена VI типа. Все C-терминальные концы α-цепей формируют глобулярный домен, который может быть отщеплен от тройной спирали бактериальной коллагеназой.

Специфичные для синдрома Гудпасчера антитела к базальной мембране клубочков направлены против домена NC1 (молекулярная масса 29 kDa) α-3 цепи молекулы коллагена VI типа в базальной мембране клубочков. Эти антитела вместе с гломерулонефритом и легочными кровотечениями сегодня характеризуют синдром Гудпасчера. ELISA тест-системы на основе чистого антигена показывают чувствительность 98-99%.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным антигеном GBM. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Peroксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке ячеек удаляется весь несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие гепатита В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, Контроли, буфер для образцов и промывочный буфер) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN_3) в чистом виде очень токсичное и химически активное вещество. В тех концентрациях, в которых оно содержится в реагентах набора, оно не представляет опасности. Несмотря на классификацию как неопасного вещества, производитель настоятельно рекомендует соблюдать принятые правила работы в лаборатории (см. 8., 9., 10.)
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промывайте водопроводную систему большими количествами воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
8. При обращении с образцами или компонентами набора используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не отбирайте образцы ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высоочищенными антигенами базальной мембраны клубочков. Готов к использованию.	1
Калибраторы анти-GBM антител в сыворотке/буферном матриксе	1 набор, 5 флаконов 1,5 мл

PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% масс), содержащие следующие концентрации: 0; 20; 40; 80 и 200 Е/мл. Готовы к использованию.	каждый
Контроли анти-GBM антител в сыворотке/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0,1% масс) (положительный и отрицательный), см. вкладыш со значениями. Готовы к использованию.	1 набор, 2 флакона 1,5 мл каждый
Буфер для образцов (Tris, NaN ₃ <0,1% масс), желтый, концентрат (5х).	1 флакон, 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, Procline 300 <0,5% об) (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи IgG антитела, меченые пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон, 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон, 15 мл
Стоп-раствор (10% раствор фосфорной кислоты). Готов к использованию.	1 флакон, 15 мл
Буферный промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <0,1% масс), концентрат (50х).	1 флакон, 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °С.
2. Хранить микропланшет в тщательно закрытом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
4. Не нагревайте реагенты набора, не допускайте попадания прямых солнечных лучей или яркого света во время хранения или использования набора.
5. Разведенные буфер для образцов и буфер для промывок стабильны не менее 30 дней при температуре 2-8 °С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Многоканальный диспенсер или многократный дозатор на 100 мкл

Вортекс

- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл

Таймер

Программное обеспечение для расчета результатов

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы цельной крови, с использованием обычных техник, избегая гемолиза.
2. Позвольте крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и без гемолиза. Гемолиза или липемии лучше избегать, но они не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 – 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов сыворотки. Это может привести к потере активности аутоантител.

Тестирование инактивированных нагреванием образцов не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не смешивайте и не заменяйте компоненты из разных лотов.
3. Все компоненты перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-28 °C).
4. Приготовьте все реагенты до начала проведения анализа. После начала тестирования его надо проводить без остановок, для получения наиболее верных и постоянных результатов.
5. Выполняйте все этапы тестирования в том порядке, как это описано в данной инструкции.
6. Всегда используйте свежие разведения образцов.
7. При внесении всех реагентов и образцов пипетируйте прямо на дно ячеек.
8. Для предотвращения загрязнения образцов меняйте наконечники перед внесением каждого следующего образца или контроля, используйте одноразовые наконечники.
9. Для получения лучших результатов очень важно тщательно промывать ячейки, и полностью удалять оставшиеся в ячейках капли буфера для промывок.
10. Строго соблюдайте время инкубаций.
11. Контроли следует анализировать как неизвестные образцы для проверки работы реагентов и набора.
12. Не используйте лунки повторно.

Концентрации контролей указаны на этикетках флаконов. Используя эти концентрации можно построить калибровочную кривую и провести полуколичественную оценку образцов сывороток пациентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое каждого флакона с 5-кратным концентратом буфера для образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Готовый буфер для образцов хранится охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.

Приготовление буфера для промывок

Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до истечения срока годности.

Приготовление образцов

Разведите все пробы пациентов 1:50 буфером для образцов перед исследованием. Смешайте 10 мкл образца и 490 мкл буфера для образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешайте. Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

Протокол анализа

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки стандартов (SA-SE), контролей (C1, C2) и разбавленных проб (P) пациентов в дублях.
2. Добавьте 100 µl стандартов, контролей и разбавленных проб пациентов в каждую ячейку.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	S	S	P	P								
	A	E	2	6								
b	S	S	P	P								
	A	E	2	6								
c	S	C	P	P								
	B	1	3	.								

Положительный результат исследования должен подтверждаться данными клинического обследования пациента, каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально.

Рекомендуется каждой лаборатории устанавливать свои собственные нормальные и патологические диапазоны сывороточных антител к GBM. Приведенные выше значения могут использоваться только в качестве ориентировочных.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. В обоих случаях результаты показали линейность во всем измеряемом диапазоне.

Воспроизводимость

Статистика для коэффициентов корреляции (CV) была рассчитана для каждого из трех образцов в 24 определениях в одной постановке для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных анализов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии		
Образец No	Значение x (МЕ/мл)	CV (%)
1	15.6	5.3
2	85.8	5.4
3	143.4	5.7
Между сериями		
Образец No	Значение x (МЕ/мл)	CV (%)
1	14.2	6.4
2	90.1	5.4
3	154.4	5.8

Чувствительность

Минимально детектируемый предел для анти-GBM антител определяется как 1 Ед/мл.

Специфичность

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным антигеном GBM. Перекрестная реактивность не обнаруживается.

Калибровка

Так как не существует международного референс-стандарта аутоантител к GBM, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase Screen ELISA предназначен для диагностических целей. Однако окончательный диагноз не должен базироваться только на результатах одного теста, но должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

На результаты анализа не оказывал гемолиз (до 1000 мг/дл), липемия (до 3 г/дл триглицеридов) или присутствие билирубина (до 40 мг/дл) в сыворотке. Использование различных коагулянтов также не оказывало влияния. Однако, из практических соображений, не рекомендуется использовать сильно гемолизированные или липемичные образцы.

ЭМА ИНКУБАЦИИ

добавить 100 μ л
калибраторов

Контроли 100 μ л или
образцы



инкубировать 30 минут при комнатной температуре

удалить содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μ л промывочного раствора

Добавить 100 μ л Раствора ферментного
конъюгата

Инкубировать 15 минут при комнатной температуре



Удалить содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μ л промывочного раствора



Добавить 100 μ л Раствора субстрата ТМБ



Инкубировать 15 минут при комнатной температуре



Добавить 100 μ л Стоп-раствора



Оставить на 5 минут



СЧИТАТЬ ПРИ 450 NM

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.

