



Инструкция по применению

Действительна от 27.09.2022

Anti-Phospholipid 10 Dot

REF 5012

Иммуноблот для определения
антифосфолипидных антител классов IgG или
IgM и к белковым кофакторам антител в
сыворотке



ДжиЭй Джинерик Эссейс ГмбХ
Людвиг-Эрхард Ринг 3
15827 Бланкенфельде-Малов ОТ Далевиц
Германия

Телефон: +49 33708 9286 0
Факс: +49 33708 4417 25

info@genericassays.com
www.genericassays.com



20 x 10



1 Назначение

Anti-Phospholipid 10 Dot - это качественный линейный иммуноферментный анализ для определения IgG или IgM антител к фосфолипидам и сывороточным белкам в сыворотке крови человека.

Anti-Phospholipid 10 Dot предназначена для расширенной диагностики антифосфолипидного синдрома (АФС) в сочетании с другими клиническими и лабораторными данными.

Иммуноблот предназначен для диагностики профессиональных лабораторий *in vitro* для ручной постановки

2 Диагностическая значимость

АФС - это аутоиммунное заболевание, которое характеризуется рецидивирующими артериальными или венозными тромбозами, тромбоцитопенией и привычным невынашиванием беременности. Первичный АФС, как и системная красная волчанка (СКВ), характеризуется появлением аутоантител к отрицательно заряженным фосфолипидам, включая антитела к кардиолипину (1). Хотя значение и патологическая актуальность фосфолипидных антител еще не до конца выяснены, выявление таких аутоантител широко распространено и играет важную роль в диагностике системных аутоиммунных заболеваний.

Антитела к кардиолипину наиболее часто используются для диагностики АФС. Если антикардиолипиновые антитела отрицательны, антитела к другим фосфолипидам особенно важны для дифференциальной диагностики. Антифосфолипидные антитела, могут встречаться у некоторых пациентов после инфекционных заболеваний, антифосфолипидные антитела пациентов с АФС реагируют преимущественно с комплексом фосфолипидов и

сывороточных белков, таких как β_2 - гликопротеин I (β_2 -GP I, аполипопротеин Н). β_2 -GP I - бета-2-гликопротеин ($\alpha\beta_2$ ГП1) - это сывороточный белок с молекулярной массой 50 кДа, он влияет на агрегацию тромбоцитов и свертываемость крови. Положительно заряженный пятый домен β_2 GP-I взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами. Это взаимодействие приводит к конформационным изменениям белка (β_2 -GP I) и созданию новых эпитопов, которые, распознаются аутоантителами к фосфолипидам. Кроме того, у пациентов с АФС могут быть обнаружены антитела, реагирующие непосредственно с сывороточными белками крови, например, аннексином V, протромбином.

3 Принцип анализа

Иммуноблот анализ является часто используемым иммунологическим методом для выявления специфических антител к различным антигенам. На гидрофобной мембране тест-полосок последовательно нанесены различные антигены. Если в образце пациента присутствуют антитела, они связываются с соответствующими антигенами. Вторичное антитело, конъюгированное с ферментом пероксидазой хрена, выявляет образовавшиеся иммунные комплексы. Бесцветный субстрат превращается в окрашенный. Интенсивность сигнала реакции пропорциональна активности антител в образце.

4 Компоненты теста

Компонент	Описание
Тест-полоски A Ag 20 20 шт.	20 тест-полосок (готовых к применению) на каждой полоске нанесены высокоочищенные антигены - Кардиолипин - Фосфатидная кислота - Фосфатидилхолин - Фосфатидилэтаноламин - Фосфатидилглицерин - Фосфатидилинозитол - Фосфатидилсерин - Аннексин V - $\alpha\beta_2$ГП1 - протромбин - Положительный контроль
Буфер B BUF 10x 1 x 15 мл, белый колпачок	Концентрированный раствор (10x)
Конъюгат IgG C CONJ G 1 x 1,2 мл, красный колпачок	Раствор поликлональных anti-human IgG антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (содержит Kathon CG)
Конъюгат IgG D CONJ M 1 x 1,2 мл, зеленый колпачок	Раствор поликлональных anti-human IgM антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (содержит Kathon CG)
Субстрат E SOLN TMB 1 x 11 мл, синий колпачок	3,3',5,5'-тетраметилбензидин (готовый к применению)
Лоток для инкубации 2 шт.	Инкубационный лоток для 12 тест-полосок
Шаблон для интерпретации 1 штука	Интерпретационный шаблон для прикрепления готовых тест полос

Оценочный шаблон для конкретного лота 1 шт.	Для определения положения антигена и интенсивности полоски
Сертификат QC 1 шт.	-
Инструкция по применению 1 шт.	-

5 Необходимые дополнительные материалы

- Общее лабораторное оборудование
- Полуавтоматические пипетки (5 - 1000 мкл) и одноразовые наконечники
- Мерные цилиндры (100 - 1000 мл)
- Качающийся или горизонтальный шейкер
- Пластиковый пинцет
- Адсорбирующая бумага или бумажное полотенце
- Дистиллированная или деионизированная вода

6 Хранение и стабильность

После получения все компоненты теста должны храниться при температуре от 2 °C до 8 °C, предпочтительно в оригинальной коробке с набором. При надлежащем хранении в оригинальной упаковке все компоненты стабильны до истечения срока годности. При надлежащем хранении при температуре от 2 °C до 8 °C все компоненты стабильны в течение как минимум 4 недель после вскрытия.

7 Общая информация

Данный продукт предназначен только для диагностики *in vitro*. Перед использованием необходимо внимательно ознакомиться с инструкцией по применению. Она действительна только для данного продукта с указанным составом и должны строго соблюдаться для обеспечения надежных результатов теста. Отклонения могут привести к ошибочным результатам теста. Компоненты не должны заменяться тестовыми реагентами других партий или других производителей.

Необходимо избегать загрязнения реагентов, используя асептические методы при извлечении аликвот из флаконов. После использования флаконы с реагентами должны быть плотно закрыты соответствующими крышками.

Перекрестное загрязнение образцов или реагентов может привести к несовместимым результатам тестирования, и его следует избегать, используя последовательную технику пипетирования.

Необходимо избегать воздействия сильного света на реагенты в течение всей процедуры испытания и хранения.

Недостаточная промывка приведет к низкой точности и повышенным измерительным сигналам. После каждого этапа промывки остатки жидкости должны быть полностью удалены.

8 Подготовка к анализу

8.1 Подготовка реагентов

Перед использованием все компоненты, включая тест-полоски, должны быть выдержаны при комнатной температуре (КТ: 18 °C - 25 °C) не менее 30 минут. Все жидкие компоненты должны быть аккуратно перемешаны для обеспечения однородности.

8.1.1 Тест-полоски

Тест-полоски поставляются в пластиковой трубе, запечатанной в алюминиевый пакет. Неиспользованные тест-полоски следует хранить в холодильнике в закрытом пластиковом пакете в оригинальной трубе с осушителем.

8.1.2 Буфер

Концентрат буфера перед использованием нужно развести дистиллированной водой 1:10 (например, 10 мл + 90 мл). Необходимо приготовить достаточное количество промывочного раствора. Разбавленный промывочный раствор храниться при температуре от 2 °C до 8 °C до 30 дней.

8.1.3 Конъюгат

Конъюгат готов к применению, окончательное разведение концентрированного конъюгата до рабочей концентрации производится во время теста.

8.1.4 Субстрат

Субстрат готов к применению. Избегайте воздействия света.

8.2 Подготовка образцов

8.2.1 Пробы пациента

Рекомендуется использовать образцы свежей сыворотки из венозной крови. Не используйте липемические гемолизные образцы или бактериально зараженные. Перед анализом, если в этом есть необходимость, центрифугированием удалите из сыворотки загрязняющие элементы, используйте для анализа только очищенные образцы. Образцы не должны подвергаться термической инактивации.

8.2.2 Хранение образцов

Образцы могут храниться при 2-8 °C в течение трех дней. Для длительного хранения требуется температура -20 °C. Если образцы должны использоваться для нескольких анализов, разделите образцы на аликвоты и храните при температуре -20 °C.

9 Производительность теста

9.1 Процедура

Тест-полоски можно брать только пластиковым пинцетом. Вся процедура должна проводиться в инкубационных лотках на качающемся, горизонтальном шейкере. Инкубационный лоток после каждого добавления растворов в лунки, коротко встряхивают вручную, чтобы убедиться, что тест-полоски полностью погружены в раствор и удаляются возможные пузырьки воздуха под полосками. Необходимо соблюдать указанное время и температуру инкубации.

Избегайте больших временных сдвигов при пипетировании проб и реагентов.

Шаг	Описание
1. Добавление буферного раствора и тест-полосок	Добавьте 1,0 мл буферного раствора в соответствующие лунки инкубационного лотка. Поместите полоски реактивной стороной вниз на поверхность жидкости. Избегайте оставшихся пузырьков воздуха под полосками.
2. Добавление образцов	Добавьте 30 мкл неразбавленных образцов в каждую лунку
3. Инкубация	Инкубируйте полоски в течение 30 мин. при комнатной температуре при встряхивании.
4. Промывочный шаг	Осторожно декантируйте или аспирируйте раствор и промойте один раз в течение 5 мин. 1,0 мл буферного раствора при встряхивании. Осторожно декантируйте раствор. Остатки жидкости необходимо удалить абсорбирующей бумагой.
5. Добавление буферного раствора	Добавьте 1,0 мл буферного раствора в каждую лунку. Убедитесь, что все полоски полностью покрыты жидкостью.

6. Добавление конъюгата	Добавьте 50 мкл готового к применению конъюгата IgG или IgM в каждую лунку
7. Инкубация	Инкубируйте полоски в течение 15 мин. при комнатной температуре при встряхивании.
8. Промывочный шаг	Осторожно декантируйте или аспирируйте раствор и промойте один раз в течение 5 мин. 1,0 мл буферного раствора при встряхивании. Осторожно декантируйте раствор. Остатки жидкости необходимо удалить абсорбирующей бумагой.
9. Добавление субстрата	Добавьте 0,5 мл готового к применению субстрата в каждую лунку
10. Инкубация	Инкубируйте полоски в течение 10 - 12 мин. при комнатной температуре при встряхивании
11. Промывка	Осторожно декантируйте или аспирируйте раствор из ячеек, промываем с добавлением 1,0 мл буферного раствора в каждую ячейку 1 x 2 мин осторожно встряхивая.
12. Промывка	Осторожно декантируйте или аспирируйте раствор из ячеек, добавляем 1,0 мл водного раствора для остановки реакции, осторожно встряхивая 1 x 2 мин
13. Сушка	Выложите тест-полоски из лунок и высушите на абсорбирующей бумаге в течение приблизительно 30 мин.
14. Анализ	Приклейте высушенные полоски на шаблон для интерпретации и оцените с помощью карточки для интерпретации.

9.2 Автоматизация

Автоматизированная обработка иммуноанализа должна быть выполнена аналогично ручному использованию и валидирована пользователем.

10 Расчёт результатов

10.1 Метрологическая прослеживаемость

Иммуноанализ калибруется с использованием внутренних эталонных образцов.

10.2 Оценка

Качественная оценка проводится путем сравнения интенсивности окрашивания антигенспецифического образца пациента с соответствующими линиями антигена на оценочном шаблоне. Интенсивность линий, указанная на шаблоне, служит в качестве контрольных cut off для качественной оценки.

Тест-полоски покрыты антигенами. Интенсивность окраски пропорциональна активности специфического антитела в образце. Образец считается положительным на специфический антиген, если окраска линии антигена более интенсивна, чем соответствующая линия антигена на оценочном шаблоне. Образец считается отрицательным для специфического антигена, если окраска линии антигена менее интенсивна или равна окраске по сравнению с соответствующей линией антигена на шаблоне оценки.

Пример оценочного шаблона

Anti-Phospholipid Dot interpretation template / Interpretationsschablone		
V8978.1.1	GA Generic Assays	
	Positive control	
	Cardiolipin	
	Phosphatidic acid	
	Phosphatidylcholine	
	Phosphatidylethanolamine	
	Phosphatidylglycerol	
	Phosphatidylinositol	
	Phosphatidylserine	
	Annexin V	
	β2-GP I	
	Prothrombin	
	Charge / Lot: V8978	

10.3 Критерии достоверности теста

Испытания действительны только при соблюдении следующих критериев действительности:

- Линия положительного контроля должна иметь интенсивное окрашивание.

Окрашивание контролей гарантирует, что тест был выполнен правильно. Если эти критерии не соблюдены, тест недействителен и должен быть повторен.

10.4 Устранение неполадок

В случае недействительного теста следует проверить сроки годности и условия хранения, время и температуру инкубации, а также точную калибровку всех используемых приборов. Если причину недействительного теста установить не удалось, обратитесь к поставщику или производителю продукта.

10.5 Референтные значения

В связи с различными показателями встречаемости заболевания в отдельных регионах, каждая лаборатория должна проверить диапазон предельных значений с помощью собственных анализов и при необходимости скорректировать его.

10.6 Интерпретация результатов тестирования

Положительный результат теста указывает на наличие специфических антител. Отрицательный результат указывает на отсутствие специфических антител, но не исключает возможность аутоиммунной реакции. В случае пограничного результата теста достоверная оценка невозможна.

10.7 Ограничения метода

Интерпретация результатов анализов всегда должна рассматриваться в сочетании с клинической картиной пациента. Диагноз не должен основываться на результатах единственного метода диагностики. Для постановки диагноза необходимо оценить все клинические и лабораторные данные. Для подтверждения необходимо провести дополнительные исследования.

11 Эксплуатационные характеристики

11.1 Аналитические характеристики

11.1.1 Точность

Точность результатов теста оценивалась путем определения внутри- и межаналитической вариабельности при анализе нескольких образцов с различной активностью антител. Различий в качественной оценке не наблюдалось.

11.2 Диапазон измерений

11.2.1 Диагностическая чувствительность и специфичность

Общая чувствительность (хотя бы одна положительная реакция) и специфичность (все реакции отрицательные) оценивались путем анализа 64 образцов от пациентов с АФС и 60 образцов от здоровых доноров крови.

	Чувствительность	Специфичность
антифосфолипидный IgG	67 %	94 %
антифосфолипидный IgM	91 %	82 %

12 Предупреждения и меры предосторожности

Продукт предназначен исключительно для использования в диагностике *in vitro* квалифицированным и персоналом. Со всеми компонентами теста и человеческими образцами следует обращаться осторожно как с потенциально опасными. Следует придерживаться надлежащей лабораторной практики (GLP) и всех соответствующих нормативных актов.

В случае повреждения изделия или неправильной или неточной информации о продукте, включая маркировку, пожалуйста, свяжитесь с производителем или поставщиком.

Данный продукт содержит препараты человеческого и/или животного происхождения. Любой материал, полученный из биологических жидкостей или органов, использованных для приготовления компонентов, был протестирован и признан отрицательным на HBsAg (поверхностный антиген вируса гепатита В) и анти-ВИЧ, а также анти-ВГС антитела. Тем не менее, со всеми компонентами и всеми образцами пациентов следует обращаться как с потенциально опасными в соответствии с национальным законодательством и соответствующими руководствами по биологической безопасности.

Поскольку продукт содержит потенциально опасные материалы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности: Не курите, не ешьте и не пейте во время работы с материалом набора или образцами. Избегайте прямого контакта с материалом набора или образцами, надевайте защитные перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Никогда не пипетируйте материал через рот. Быстро вытирайте разливы и тщательно мойте пораженную поверхность дезинфицирующим средством. Тщательно мойте руки после использования.

Некоторые реагенты содержат Kathon CG (< 1,0 %) в качестве консерванта, могут вызвать сенсибилизацию кожи (H317), их нельзя глотать или допускать контакта с кожей или слизистой (P280, P333+P313).

Необходимо соблюдать содержащуюся в паспорте безопасности информацию о возможных опасностях, мерах первой помощи, мерах в случае непреднамеренного выброса больших количеств, обращении и хранении, средствах индивидуальной защиты, информацию об утилизации, а также информацию о токсикологии.

О любом серьезном инциденте, произошедшем в связи с устройством, необходимо сообщить производителю и компетентному органу государства-члена, в котором находится пользователь и/или пациент.

13 Утилизация

Для дезактивации и утилизации следует придерживаться рекомендаций МЗ, а также соответствующих местных и национальных экологических инструкций и правил. Образцы, потенциально загрязненные материалы и инфекционные отходы должны быть обеззаражены, например, автоклавированием в течение 20 мин. при 121 °C.

14 Ссылки

- Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young GG, Loizou S and Hughes GRV: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet 1983, 11, 1211.

- Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, DeBaets MHVan Breda-Vriesman PJC, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein factor. Lancet 1990, 335, 1544 – 7.

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006, 4, 295 – 306.

- Tkachenko O, Lapin S, Mazing A, Emanuel V, Belolipetskaia E, Beliaeva I, Myachikova V, Maslyansky A, Schierack P, Roggenbuck D. Profiling of non-criteria antiphospholipid antibodies in patients with SLE: differentiation of thrombotic SLE patients and risk of recurrence of thrombosis. Lupus. 2020, 29, 490 – 8.

15 Символы



Производитель



Маркировка соответствия CE



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Номер по каталогу



Уникальный идентификатор устройства



Код партии



Температурный диапазон



Срок годности



Ознакомьтесь с инструкцией по применению



Содержит достаточно для <n> тестов



Не используйте повторно



Осторожно!



Предупреждение



Биологический риск



Беречь от солнечного света



Тест-полоски



Конъюгат



Буфер



Субстрат

16 Изменения

Изменения в действующих инструкциях по применению

Текущая версия	007/09.2022
Резюме изменений	Редакционные изменения во всех разделах; добавлен предупреждающий символ для соответствия DIN EN ISO 15223-1:2022-02