



Инструкция по применению

Действительна от

Anti-Phospholipid screen

REF 4050

Иммуноферментный анализ для определения антител IgG и/или IgM к фосфолипидам в сыворотке крови



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



1 Назначение

Anti-Phospholipid screen - это количественный иммуноферментный анализ для определения IgG и/или IgM антител к фосфолипидам (кардиолипин, фосфатидилсерин, -инозитол, -этанолламин, фосфатидная кислота и 2-гликопротеин I) в сыворотке крови человека.

Anti-Phospholipid screen предназначен для диагностики антифосфолипидного синдрома (АФС/АРАС) в сочетании с другими клиническими и лабораторными данными.

Иммуноанализ предназначен для ручной профессиональной диагностики *in vitro*.

2 Диагностическая значимость

АФС - это аутоиммунное заболевание, характеризующееся такими клиническими симптомами, как артериальные или венозные тромбозы, тромбоцитопения и рецидивирующая потеря плода. АФС может протекать изолированно (первичный АФС) или в сочетании с основным заболеванием, как при (СКВ) системной красной волчанке (вторичный АФС). Заболевание характеризуется стойким наличием антифосфолипидных антител. Хотя значение и патологическая значимость фосфолипидных антител еще не до конца выяснены, выявление таких аутоантител широко распространено и играет важную роль в диагностике системных аутоиммунных заболеваний.

Антифосфолипидные антитела, которые также могут встречаться у некоторых пациентов после инфекционных заболеваний, АТ у пациентов с АФС преимущественно реагируют с комплексами фосфолипидов и белковыми кофакторами этих аутоантител, таких как бета-2-гликопротеин 1 ($\alpha\beta_2$ ГП1, апополипротеин Н) (2, 3). Бета-2-гликопротеин 1 - это сывороточный белок с молекулярной массой 50 кДа, он влияет на агрегацию тромбоцитов и коагуляцию. Положительно заряженный пятый домен $\alpha\beta_2$ ГП1 взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами такими как кардиолипин. Это взаимодействие приводит к конформационным изменениям белка и созданию новых эпитопов, которые, помимо, распознаются аутоантителами к фосфолипидам.

3 Принцип анализа

ИФА - это иммуноферментный анализ для определения специфических антител. Лунки микротитровального планшета покрыты антигенами, специфичными для данного теста. Если в образце пациента присутствуют антитела, они связываются с антигенами. Вторичное антитело, конъюгированное с ферментом пероксидазой, выявляет образовавшийся иммунный комплекс. Бесцветный субстрат превращается в окрашенный продукт. Интенсивность сигнала продукта реакции пропорциональна активности антител в образце. При помощи фотометра измеряется оптическая плотность (ОП).

4 Комплектность набора

Компонент	Описание
Микротитровальный планшет A Ag 96 1 шт.	12 разделяемых микротитровальных стрипов (готовых к применению), 8 лунок в каждом стрипе, каждая лунка покрыта очищенным человеческим кардиолипином, бычьим фосфатидилсерином, -инозитолом, -этанолламином, фосфатидной кислотой и чело-веческим 2-гликопротеином I
Калибратор 0 - 4 CAL 5 x 1 мл, белый колпачок	Окрашенный раствор человеческой сыворотки (готов к применению; содержит ПроКлин 950) Активность антител указана в сертификате контроля качества.
Отрицательный контроль N CONTROL - 1 x 1 мл, зеленый колпачок	Окрашенный раствор человеческой сыворотки (готов к применению; содержит ПроКлин 950) Активность антител указана в сертификате контроля качества.
Положительный контроль P CONTROL + 1 x 1 мл, красный колпачок	Окрашенный раствор человеческой сыворотки (готов к применению; содержит ПроКлин 950) Активность антител указана в сертификате контроля качества.
Разбавитель пробы S DIL 1 x 100 мл, черный колпачок	Окрашенный раствор (готов к применению; содержит ПроКлин 950)
Промывочный буфер B BUF WASH 10x 1 x 100 мл, белый колпачок	Концентрированный раствор (10x; содержит ПроКлин 950)
Конъюгат IgG D CONJ G 1 x 15 мл, красный колпачок	Окрашенный раствор поликлонального anti-human антитела IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (готов к применению; содержит ПроКлин 950)
Конъюгат IgM E CONJ M 1 x 15 мл, зеленый колпачок	Окрашенный раствор поликлонального anti-human антитела IgM, конъюгированного с пероксидазой хрена (готов к применению; содержит ПроКлин 950)
Субстрат F SOLN TMB 1 x 15 мл, синий колпачок	3,3',5,5'-тетраметилбензидин (готов к применению)
Стоп-реагент G H2SO4 0,25M 1 x 15 мл, желтый колпачок	0,25 М серная кислота (готовая к применению)
Покрывающая фольга 2 шт.	-
Сертификат анализа 1 шт.	-
Инструкция по применению 1 шт.	-

5 Необходимые дополнительные материалы

- общее лабораторное оборудование
- полуавтоматическая пипетка на 10 - 100, 100 - 1000 мкл
- многоканальная пипетка на 50-200 мкл
- наконечники пипеток
- лабораторная магнитная мешалка-шейкер для микропланшетов
- устройство для мойки для микропланшетов или моющая гребенка
- фотометр для микропланшетов пластин микротитратора с оптическими фильтрами на 450 нм и 620 нм или 690 нм
- адсорбирующая бумага или бумажное полотенце
- дистиллированная или деионизированная вода

6 Хранение и стабильность

После получения все компоненты теста должны храниться при температуре от 2 °С до 8 °С, предпочтительно в оригинальной коробке с набором. При надлежащем хранении в оригинальной упаковке все компоненты стабильны до истечения срока годности.

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 микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры (КТ: 18 °С - 25 °С) в течение не менее 30 минут. Все жидкие компоненты должны быть аккуратно перемешаны для обеспечения однородности.

8.1.1 Микропланшет

Микротитровальный планшет запечатан в алюминиевый пакет. Неиспользованные тест-полоски всегда следует хранить в холодильнике и защищать от влаги с помощью влагопоглотителя в правильно запечатанном алюминиевом пакете. Тщательно запечатанные тест-полоски можно использовать в течение 8 недель после вскрытия.

8.1.2 Калибраторы

Калибраторы готовы к применению и не подлежат дальнейшему разбавлению. Калибраторы должны использоваться в каждом испытании.

8.1.3 Контроли

Положительные и отрицательные контроли готовы к применению и не подлежат дальнейшему разбавлению. Контроли должны использоваться в каждом испытании. Лаборатории также могут валидировать свои собственные контрольные образцы и использовать их в качестве альтернативы.

8.1.4 Разбавитель проб

Разбавитель для образцов готов к применению.

8.1.5 Промывочный буфер

Промывочный буфер является концентрированным и перед использованием должен быть разбавлен 1:10 дистиллированной водой (например, 100 мл + 900 мл). Необходимо приготовить

достаточное количество промывочного раствора. Разбавленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С до 30 дней.

8.1.6 Конъюгат

Конъюгат готов к применению и стабилен до 8 недель после открытия при хранении при температуре от 2 °С до 8 °С.

8.1.7 Субстрат

Субстрат готов к применению. Следует избегать воздействия сильного света на раствор субстрата.

8.1.8 Стоп-реагент

Стоп-раствор готов к применению.

8.2 Подготовка образцов

8.2.1 Пробы пациента

Производится забор крови из вены, рекомендуется использовать свежесобранную сыворотку. Не используйте липемические гемолизные образцы или бактериально зараженные. Перед анализом, если в этом есть необходимость, центрифугированием удалите из сыворотки любые включения и используйте для анализа только очищенные образцы. Образцы не должны подвергаться термической инактивации.

8.2.2 Разбавление пробы

Образцы должны быть разбавлены 1:101 (например, 10 мкл + 1000 мкл) разбавителем для образцов и тщательно перемешаны. Следует избегать образования пены.

8.2.3 Хранение образцов

Образцы можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более трех дней. Для длительного хранения требуется температура -20 °С. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания. Для многократного использования образцы следует аликвотировать и хранить при -20 °С.

9 Производительность теста

9.1 Схема пипетирования

Рекомендуется следующая схема пипетирования:

	1	2	3	4
A	CAL 0	Образец 2		
B	CAL 1	Образец 3		
C	CAL 2	Образец 4		
D	CAL 3	Образец 5		
E	CAL 4	...		
F	N	...		
G	P	...		
H	Образец 1	...		

9.2 Процедура

Необходимо соблюдать указанные время и температуру инкубации и избегать значительных временных сдвигов при пипетировании образцов и реагентов. После добавления реагентов микротитровальный планшет следует коротко встряхнуть.

Шаг	Описание
1. Добавление калибраторов, контролей и разбавленных проб	Добавьте 100 мкл готовых к применению калибраторов, контролей и разбавленных образцов в каждую лунку
2. Инкубация	Накройте планшет и инкубируйте в течение 60 мин. при КТ
3. Промывка	Полностью удалите содержимое лунок стряхиванием и удалите остатки жидкости в стрипах, прижав их к фильтровальной бумаге. Промойте лунки 3 раза по 300 мкл/лунку разведённым Промывочным буфером, встряхивая лунки с буфером в течение 5 секунд

4. Добавление конъюгата	Добавьте 100 мкл готового к применению конъюгата в каждую лунку
5. Инкубация	Накройте планшет и инкубируйте в течение 30 мин. при КТ
6. Промывка	Полностью удалите содержимое лунок стряхиванием и удалите остатки жидкости в стрипах, прижав их к фильтровальной бумаге. Промойте лунки 3 раза по 300 мкл/лунку разведённым Промывочным буфером, встряхивая лунки с буфером в течение 5 секунд
7. Добавление субстрата	Добавьте 100 мкл готового к применению субстрата в каждую лунку
8. Инкубация	Накройте планшет и инкубируйте в течение 15 мин. в темноте при КТ
9. Добавление стоп-реагента	Добавьте 100 мкл готового к применению стоп-реагента в каждую лунку
10. Анализ	Измерьте (ОП) в фотометре для микропланшета на длине волны 450 нм против 620 или 690 нм в течение 30 минут после добавления стоп-реагента.

9.3 Автоматизация

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

10 Расчёт результатов

10.1 Метрологическая прослеживаемость

Иммуноанализ калибруется с использованием внутреннего контрольного образца. Количественные результаты выражаются в МЕ/мл.

10.2 Стандартная кривая

Для создания стандартной кривой, оптические сигналы (ОП) калибраторов (CAL) соотносятся с активностью антител и коррелируют с помощью 4-параметрической логистической регрессии. Используя стандартную кривую, полученную таким образом, активность антител в неизвестных образцах может быть определена непосредственно по их ОП.

10.3 Критерии достоверности теста

Испытания действительны только при соблюдении следующих критериев действительности:

- ОП CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4
- ОП CAL 4 > 1.2
- Отрицательный контроль должен быть оценен отрицательно.
- Положительный контроль должен быть оценен положительно и представлять активность антител в пределах диапазона валидности, указанного в сертификате контроля качества.

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 Референсные значения

Референсные диапазоны указаны ниже:

	Интерпретация
Активность антител < 10 МЕ/мл.	отрицательный
Активность антител ≥ 10 МЕ/мл.	положительный

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 вариации при анализе нескольких образцов с различной активностью антител.

IgG	Внутриассортиментная точность		Межпроверочная точность	
	ОП	КВ (%)	ОП	КВ (%)
Образец 1	187.4	4.8	208.4	6.8
Образец 2	57.2	6.7	60.2	3.9
Образец 3	9.8	6.7	10.9	4.9

IgM	Внутриассортиментная точность		Межпроверочная точность	
	ОП	КВ (%)	ОП	КВ (%)
Образец 1	127.4	9.0	127.4	12.7
Образец 2	18.1	4.3	18.5	4.5
Образец 3	5.2	4.1	5.7	7.5

11.1.2 Диапазон измерений

Надежная точность, достоверность, прецизионность, линейность и воспроизводимость результатов тестирования наблюдались в пределах диапазона измерения анализа от LoQ до верхнего калибратора в комплексных исследованиях. Образцы с результатами тестирования выше верхнего калибратора должны быть представлены как >max. Образцы с результатами ниже LoQ должны быть представлены как <min. Если наблюдаются результаты тестирования выше верхнего калибратора, образцы могут быть протестированы в более высоком разведении. Полученная активность антител должна быть умножена на дополнительный коэффициент разведения.

11.2 Диагностические характеристики

11.2.1 Аналитическая чувствительность и специфичность

Чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа на антитела IgG оценивались путем анализа 60 образцов сыворотки крови пациентов с антифосфолипидным синдромом и 153 образцов от неизбранных доноров крови.

	Значение параметра
Чувствительность	86,7 %
Специфичность	98.0 %

Чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа на антитела IgM оценивались путем анализа 42 образцов сыворотки крови пациентов с антифосфолипидным синдромом и 131 образца от неизбранных доноров крови.

	Значение параметра
Чувствительность	38.1 %
Специфичность	98.5 %

12 Предупреждения и меры предосторожности

Продукт предназначен исключительно для использования в диагностике *in vitro* квалифицированным, уполномоченным и обученным персоналом. Со всеми компонентами теста и 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 жидкостей или органов, использованных для приготовления компонентов, был протестирован и признан отрицательным на HBsAg (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, надев 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 ПроКлин (< 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, информации 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.
- McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a

lipid-binding factor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 4120 – 4.

15 Символы

	Производитель
	Маркировка соответствия CE
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	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 солнечных лучей
	Микротитровальный планшет
	Калибраторы
	Отрицательный контроль
	Положительный контроль
	Разбавитель пробы
	Конъюгат
	Промывочный буфер
	Субстрат
	Стоп-реагент

16 Изменения

Изменения в действующих инструкциях по применению	
Текущая версия	005/09.2022
Резюме изменений	Редакционные изменения; графический символ предупреждения был добавлен в соответствии с Постановлением ЕС 1272/2008