

СР	7041/2007
	11.10.2012

Перший заступник
Голови Державної служби України
з лікарських засобів
І.Б.Демченко
11 жовтня 2012 р.

Інструкція
з використання тест-системи
для визначення антикардіоліпінових антитіл в сироватці крові
АТ до кардіоліпіну – ІФА

IN VITRO

Зберігати при 4-10°C

Принцип методу

У наданій тест-системі використовується принцип непрямого імуноферментного аналізу. У лунку планшета з іммобілізованим антигеном (кардіоліпін) вносять досліджуваний зразок. АТ до кардіоліпіну з зразка зв'язуються з антигеном на поверхні лунки. Незв'язаний матеріал видаляється відмивкою. У лунку вносять кон'югат (антитіла проти IgG людини, мічені пероксидазою). Після повторної відмивки активність ферменту, зв'язаного на поверхні лунки планшета, проявляється додаванням субстрату, та вимірюється при довжині хвилі 450 нм.

Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна кількості АТ до кардіоліпіну в зразку.

Клінічне значення

Антикардіоліпінові антитіла – це антитіла до фосфоліпідів клітинних мембран. Є основним показником наявності антифосфоліпідного синдрому (АФС) у хворих. В сироватці здорових людей антитіла до кардіоліпіна можуть бути присутні в незначній кількості, але при підвищенні цього рівня з'являється якісно нова реакція в системі гемостазу - порушується нормальне функціонування ендотелію кровеносних судин, виникає звуження судин і утворення судинних тромбів. При цьому уражаються судини серця, головного мозку, нирок, печінки, надниркових залоз. Високий титр антитіл часто супроводжується ризиком розвитку тромбозу вен, інфаркту міокарда.

Підвищення рівня антитіл є чутливим і специфічним лабораторним тестом, що характеризує ризик виникнення тромботичних ускладнень. При вагітності через тромбоемболічні пошкодження трофобласта та плаценти можлива загибель плоду, повторні викидні, відшарування плаценти, гіпотрофія та гіпоксія плоду.

Антикардіоліпінові антитіла з'являються при наступних захворюваннях: АФС, тромбоцитопенії, гемолітичній анемії, аутоімунних захворюваннях, красному вовчаку, ревматоїдному артриті, вузликовому периартеріїті, інфаркті міокарду, інсульті, нестабільній стенокардії, інфекціях (туберкульоз, лепра, стафілококова, стрептококова інфекції, кір, мононуклеоз, краснуха, СНІД), артеріальній гіпертензії, ендартеріїті, системному атеросклерозі, акушерській патології. Крім того, АФС може супроводжуватися неврологічною патологією, ураженням шкіри (сітчасте ливедо, шкірні виразки).

Склад набору

1. Планшет з іммобілізованим антигеном, 8x12 лунок (1 шт.)
2. Стрічка для заклеювання планшет (1 шт.)
3. Набір контролів, 0.15 мл (2 фл.)
4. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) концентрат 10 х, 30 мл (1 фл.)
5. Кон'югат, 11 мл (1 фл.)
6. Субстрат, 11 мл (1 фл.)
7. Зупиняючий розчин, 11 мл (1 фл.)

Аналітичні характеристики

Очікуванні межі оптичної щільності негативного контролю 0.1-0.3 оптичних одиниць (ОО).

Коефіцієнт варіації результатів визначень не більш 10%.

Матеріал для дослідження

Використовуйте свіжу, вільну від домішок сироватку крові. Зберігайте зразки не більше 48 годин при 4-10°C. Довгострокове зберігання допускається в замороженому вигляді при температурі -20°C. Повторне заморожування-відтавання не допускається. Не використовуйте мутні, хильозні та гемолітичні зразки.

Перелік необхідного устаткування

Автоматичні одно- та багатоканальні дозатори фіксованого або варіабельного об'єму 5-1000 мкл.

Загальне лабораторне устаткування.

Аналізатор імуноферментний з довжиною хвилі 450 нм.

Підготовка реагентів

1. Перед використанням набір витримайте при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. До цього не знімайте стрічку для заклеювання з планшету, щоб не утворювався конденсат.
2. Приготуйте необхідну кількість розчину ФСБ. Для цього концентрат розбавте 10-кратним об'ємом дистильованої води в чистому посуді. Отриманий розчин стабільний протягом 5-ти діб при кімнатній температурі або 30 діб у холодильнику 4-10°C.

Проведення аналізу

1. Помістіть у рамку потрібну кількість стрипів - 4 лунки для контролів та зразків в 2 повторах.
2. Внесіть у лунки 90 мкл розчину ФСБ.
3. Внесіть у лунки 10 мкл контролів та досліджуваних зразків.
4. Інкубуйте 40 хвилин при температурі 20-25°C, періодично струшуючи або на шейкері.
5. Відмийте стрипи 3 рази розчином ФСБ.
6. Внесіть у лунки 100 мкл кон'югату.
7. Інкубуйте 40 хвилин при температурі 20-25°C, періодично струшуючи або на шейкері.
8. Відмийте стрипи 5 разів розчином ФСБ.
9. Внесіть у лунки 100 мкл субстрату.
10. Інкубуйте 15-20 хвилин при температурі 20-25°C в темному місці.
11. Внесіть у лунки 100 мкл зупиняючого розчину.
12. Не більше як через 5 хв. виміряйте оптичну щільність (ОЩ) у лунках на фотометрі при довжині хвилі 450 нм. Бланк фотометра виставляйте проти повітря.
13. Визначте концентрацію АТ до кардіоліпіну в досліджуваних зразках по формулі.

Примітки

1. Не змішуйте та не використовуйте в одній постановці реагенти різних серій.
2. Після використання реагенту негайно закривайте кожен флакон **своєю** кришкою.
3. Усі проби і стандарти бажано ставити в двох паралелях (повторах).
4. Відмивання планшета може проводитися як вручну, так і з використанням автоматичних пристроїв. Вносити по 250 мкл розчину ФСБ в лунки при кожному відмиванні. Затримка при відмиванні («замочування») не потрібна. Після закінчення ручного відмивання різко переверніть планшет на фільтрувальний папір для видалення залишків буферу.

Оцінка результатів дослідження

Для визначення наявності антитіл використовують індекс реакції (ІР):

$$IP = \frac{E_{doc}}{E_{neg}}$$

де: E_{doc} - оптична щільність досліджуваної сироватки,

E_{neg} - оптична щільність негативного контролю.

Референтні величини

Грунтуючись на результатах досліджень, проведених лабораторіями, рекомендуємо користуватися нормами, приведеними нижче. Разом з тим, відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити для себе параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

IP >1.9 свідчить про наявність антитіл. Враховуючи можливу похибку аналізу досліджувану сироватку вважають позитивною при IP >2.0.

IP ≤2.0 проба вважається негативною.

Вимоги безпеки

1. Категорично забороняється піпетування ротом.
2. Засобами індивідуального захисту при роботі з наборами є марлеві пов'язки та гумові рукавички.
3. Знезараження сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з наказом МОЗ СРСР №408 від 29.12.89 р. «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в стране».

Умови зберігання

Набір повинен зберігатися при температурі від 4-10°C. Не допускається замороження!

Після розкриття пакета **ретельно заклейте** лунки, що залишилися, стрічкою для заклеювання, щоб запобігти впливу вологи під час зберігання.

Усі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, якщо зберігати його щільно закритим, в захищеному від світла місці та запобігати забруднення під час його використання.

Гарантії виробника

1. Виробник гарантує відповідність якості наборів вимогам ТУ при додержанні споживачем умов зберігання.
2. Гарантійний термін зберігання становить 6 міс. з дня виготовлення набору.

СР	7041/2007
	11.10.2012

ТОВ НВЛ "Гранум"
61050, м. Харків
вул. Юр'ївська, 17
т/ф (057) 768-07-14

Паспорт

Тест-система для визначення
антикардіоліпінових антитіл в сироватці крові

АТ до кардіоліпіну – ІФА

IN VITRO

Серія

718/3

Дата виготовлення

22.07.2013

Термін придатності

22.01.2014

Зберігати при 4-10°C

№/п	Показник	Вимоги ТУ У 24.4-31557962-002-2002		Результати контролю
1. Показники правильності визначення				
1.1	Очікуванні межі ОЩ негативного контролю, ОО	0.1-0.3		відповідає
1.2	Коефіцієнт варіації результатів визначень не більш, %	10		відповідає
2. Зовнішній вигляд, комплектація				
2.1	Планшет з іммобілізованим антигеном	полістирол	8x12	відповідає
2.2	Стрічка для заклеювання планшет		1 шт.	відповідає
2.3	Набір контролів	жовтий	2 фл. х 0.15 мл	відповідає
2.4	Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) концентрат 10х	прозорий	1 фл. х 30 мл	відповідає
2.5	Кон'югат	синій	1 фл. х 11 мл	відповідає
2.6	Субстрат	прозорий	1 фл. х 11 мл	відповідає
2.7	Зупиняючий розчин	прозорий	1 фл. х 11 мл	відповідає

Термін зберігання – 6 місяців з дня виготовлення.

Висновок ВТК: відповідає ТУ У 24.4-31557962-002-2002