



产品说明书

产品编码 5012

2014 年 9 月 09 日

抗磷脂抗体谱 (IgG 或 IgM) 10 项检测试剂盒

(Anti-Phospholipid 10 Dot)

- 20 x10 个测试

IVD 体外诊断试剂盒

免疫斑点法测定人血清中抗磷脂、膜联蛋白 V、β2GPI、和凝血酶原抗体 IgG 或 IgM

REF	产品编码	LOT	批号
	参阅随附文件		制造商
	温度限制		使用者
	操作说明书		生物风险



GA GENERIC ASSAYS GmbH

Ludwig-Erhard-Ring 3

15827 Dahlewitz, Germany

Telefon: +49 (0) 33708-9286-0
 Fax: +49 (0) 33708-9286-50

www.genericassays.com

预期用途

抗磷脂抗体谱 (IgG 或 IgM) 10 项检测试剂盒 (下称本试剂盒) 用于定性检测人血清中抗磷脂、膜联蛋白 V、β2GPI、和凝血酶原抗体 IgG 或 IgM, 从而对抗磷脂抗体综合征 (APAS) 进行诊断。

APAS 是一种自身免疫性疾病。临床症状包括动脉或静脉形成血栓, 血小板减少或者复发性胎儿损失。原发性 APAS 以及系统性红斑狼疮 (SLE) 的特征在于出现带负电荷磷脂的自身抗体, 包括心磷脂抗体 (1)。虽然磷脂抗体的显著性和病理学相关性尚未完全阐明, 但这种自身抗体的检测已广泛认可, 并在系统性自身免疫疾病的诊断中发挥重要作用。

抗心磷脂抗体最常用于 APAS 的诊断。如果抗心磷脂抗体的检测为阴性, 则其他磷脂的抗体的鉴别与诊断就十分重要。

APAS 患者的抗磷脂抗体优先结合磷脂与辅因子 β2-糖蛋白 I (β2-GP I, 载脂蛋白 H) 的复合物 (2,3), 而在患有传染病的患者中也可以检测仅针对磷脂的抗体。β2-GP-I 是一种分子量为 50 kDa 的血清蛋白, 可影响血小板聚集和凝血。带正电的 β2GP-I 第五个结构域与带负电荷的磷脂相互作用。这种相互作用导致蛋白质的构象变化和新表位的产生, 从而由自身免疫磷脂自身抗体显著性识别。除此之外, 在 APAS 患者中还可以检测到与血清蛋白直接反应的抗体, 如膜联蛋白 V、凝血酶原。

(1) 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

(2) 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 335:1544-1547

(3) 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 87:4120-4124

测试原理

本试剂盒运用免疫斑点法定性检测人血清中磷脂与血清蛋白上的 IgG 或 IgM 抗体。

本试剂盒包含 20 个测试条带。测试条带由喷有不同自身免疫抗原线的膜组成。一条线作为阳性对照, 其他 10 条线包含高度纯化的抗原制剂: (心磷脂, 磷脂酸, 磷脂酰胆碱, 乙醇胺, - 甘油, - 肌醇, - 丝氨酸, 膜联蛋白 V, β2GPI, 凝血酶

原)

在第一步反应中，患者样品的自身抗体与固定在固相（膜）上的靶抗原结合。在室温下反应 30 分钟，同时摇动，通过洗涤步骤除去未结合的样品组分。

在第二步中，结合的抗体与辣根过氧化物酶（POD）标记的抗人 IgG 或抗人 IgM 抗体发生特异性反应。

辣根过氧化物酶将无色底物溶液转化为膜上的深紫色沉淀线。在室温下振荡 10 分钟后，通过两个洗涤步骤停止反应。条带干燥之后，直接判读结果。

病人标本

标本收集和储存

通过静脉穿刺取血。离心凝固后分离血清。

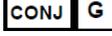
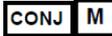
标本在 2-8°C 可保存 3 天，长期保存需放置在 -20°C 环境。

避免反复冻融。如果标本要用作很多试验使用，等分样品后在 -20°C 环境保存。

使用前的准备

使用本试剂盒测定的样品可不必稀释，直接使用。在移液前要小心地搅拌样品以确保均匀性。

20x10 个测试的各种组分

<p>A</p> 	<p>斑点条带</p> <p>20 个测试条，每个测试条包含 11 条测试线 其中 10 条检测线涂有高浓度的抗原。</p> <ul style="list-style-type: none"> - 心磷脂 - 磷脂酸 - 磷脂酰胆碱 - 磷脂酰乙醇胺 - 磷脂酰甘油 - 磷脂酰肌醇 - 磷脂酰丝氨酸 - 膜联蛋白 V. - B2GPI - 凝血酶原 - 阳性对照 	<p>20 个真空密封的条带</p>
<p>B</p> 	<p>缓冲液，10 倍</p> <p>可配置 150ml</p> 	<p>15ml 浓缩液 白色瓶盖</p>
<p>C</p> 	<p>IgG 连接物，21 倍</p> <p>偶联辣根过氧化物酶（POD）的（兔）抗人 IgG</p>	<p>1.2ml 直接使用 红色瓶盖</p>
<p>D</p> 	<p>IgM 连接物，21 倍</p> <p>偶联辣根过氧化物酶（POD）的（兔）抗人 IgM</p>	<p>1.2ml 直接使用 绿色瓶盖</p>

<p>E</p> 	<p>底物</p> <p>3,3',5,5'-四甲基联苯胺</p>	<p>11ml 直接使用 蓝色瓶盖</p>
<p>F</p>	<p>反应托盘</p> <p>12 个点状条带</p>	<p>2X</p>
<p>G</p>	<p>判读模板</p>	<p>1X</p>

额外需要的材料

- 微量移液管 100-1000µl
- 微量移液管 10 - 100µl
- 移液器吸头
- 摇床（推荐摇摆摇床）
- 带刻度的量筒
- 蒸馏水或去离子水
- 塑料镊子
- 纸巾

尺寸和储存

本试剂盒用于磷脂的 IgG 或 IgM 抗体的 20 次测定。

整个试剂盒的标签上有每种组分的标签，上面标注每种组分的效期。

到货后，本试剂盒的每种组分必须在 2-8°C 保存，推荐试剂盒原装保存。

打开真空密封后，测试点条在 2-8°C 下在塑料薄膜袋中可稳定保存 4 周。

试剂盒打开后其他成分在 2-8°C 温度下，可稳定保存 4 周。

使用前的准备

所有洗涤步骤都在室温下进行。因此，溶液（缓冲液、洗液）必须及时放置到室温。

斑点条带是真空密封的，使用时用手术刀或者切割器从保护膜上切下足够的条带。未使用的条带要保持干燥，并且存放在额外提供的塑料箔袋中。

用去离子水或者蒸馏水稀释 10 倍的浓缩缓冲液（1+9）。

每个测试条需要 5ml 缓冲液。

例如：

15ml 浓缩缓冲液加入 135ml 蒸馏水。

提前准备的溶液（用 B 稀释）在 2-8°C 温度下可以保存 30 天。

所有其他组分在效期前可以直接使用。

避免底物暴露在阳光下。

反应托盘清洗流程

使用洗涤液将反应盘浸泡 30 分钟，然后用清水冲洗。

接下来用任意类型的酒精（甲醇、丙醇或乙醇）在摇床中浸泡 30 分钟，然后清水冲洗。

用棉签清洁反应盘，清水冲洗，然后晾干。

实验流程

严格遵守实验流程避免人员换岗轮换。

整个实验必须在摇床上进行（推荐使用摇动摇床，每分钟40-50次）。

整个试验在室温（18-25℃）下进行。确保所需溶液（缓冲液、底物）是室温（18-25℃）。

1	取出溶液和足够数量的斑点条带，温柔混匀溶液。
2	向每个孵育槽中加入 1ml 缓冲液（B）。
3	将带有反应端的条带放入相应的孵育槽中。
4	加入 30μl 血清（最终稀释液 1 + 33）
5	室温下反应 30 分钟。同时震荡。
6	弃液（注意：小心地转动反应托盘并小心地倾倒缓冲溶液，任何剩余的液体必须用吸水纸去除）。在室温下用 1ml 缓冲溶液（B）洗涤 5 分钟，同时摇动。
7	移取 1ml 缓冲溶液（B）并加入各自的孔中。 IgG 测定：50μl 结合物 C。 IgM 测定：50μl 结合物 D。
8	室温震荡反应 15 分钟
9	弃液（注意：小心翻转反应托盘轻轻倒出缓冲液，任何残留液体需用滤纸吸干）。在室温下用 1ml 缓冲溶液（B）洗涤 5 分钟，同时摇动。
10	向每个孵育槽中分别加入 0.5 ml 底物（E）
11	室温下震荡反应 10 分钟
12	弃液。用 1ml 洗液（B）室温震荡清洗 2 分钟。
13	弃液（注意：小心翻转反应盘轻轻倒出缓冲液，任何残留液体需用滤纸吸干）。在室温下用 1ml 蒸馏水震荡洗涤 2 分钟以停止反应。
14	从孵育槽中收集条带并用滤纸从条带反应面吸干。大约 30 分钟后可得实验结果。

数据处理

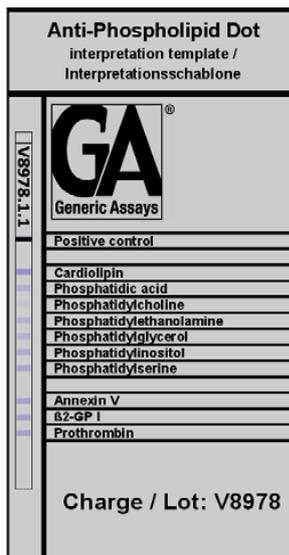
测试结果的评价要借助于生产批次特异性的评价模板。所以测试条带必须干燥并粘到模板上。

阳性对照线在任何情况下必须是阳性。阳性对照线的颜色确保实验是正确操作且各种组分正常。如果阳性对照线条没有颜色则不能读取实验数据。

测试线条包被高度纯化的人抗原，并且在检测时与样品的抗体特异性结合。

评价模板中给出的条带的强度，作为阳性对照和阴性对照的质控。

参考值



阳性结果：

如果某种抗体线条的明暗度强于评价模板给出条带的明暗度，则认为该样本是阳性的。

阴性结果：

如果某种抗体线条的明暗度弱于评价模板给出条带的明暗度，则认为该样本是阴性的。

验证：

为了读出结果，测试线条的阳性对照必须显示出明显的颜色。

方法的局限性

健康个体被检测试剂盒检测应该显示阴性。然而，无临床症状的个体抗体检测也会有阳性反应。

任何医学诊断都不应该仅仅基于体外诊断的结果。医生应该考虑全部临床和实验结果来确认一个诊断。

特征分析数据

特异性和灵敏度

通过测量 50 份正常血清获得本试剂盒的诊断特异性。IgG 检测显示 3 个样品至少有 1 个抗体(特异度 94%)。IgM 检测结果显示，9 个血清中至少有一个抗体呈阳性(特异性 82%)。

通过测量来自 APAS 患者的 64 份血清获得本试剂盒的诊断灵敏度。IgG 检测显示 43 份血清(67.2%)至少有一种抗体(个体敏感性：心磷脂 62.5%，磷脂酸 42.2%，P-choline 0，P-乙醇胺 0，P-甘油 32.8%，P-肌醇 45.3%，P-丝氨酸 59.4%，膜联蛋白 V 4.7%，β2GPI 56.3%，凝血酶原 14.1%)。在 IgM 中，在 58 份血清中检测到抗体(90.6%) (个体敏感性：心磷脂 71.9%，磷脂酸 60.9%，P-胆碱 0，P-乙醇胺 57.8%，P-甘油 34.4%，P-肌醇 42.2%，P-丝氨酸 62.5%，膜联蛋白 V 46.9%，β2GPI 65.36%，凝血酶原 65.5%)。在 61 份血清中，发现至少一种 IgG 或 IgM 抗体(95.3%)。

反应流程

抗磷脂抗体谱 (IgG 或 IgM) 10 项检测试剂盒 (5012)

所有步骤均在室温下进行 (18 -25°C) ; 所需的试剂 (条带, 缓冲溶液, 结合物) 需要及时放置到室温。

1	使用前, 将所有需要的试剂和条带数量放置室温 (18 -25°C)
2	每个条带加入 1ml 缓冲溶液 (由 B 稀释)
3	将反应端的条带放在缓冲溶液的底部
4	加入 30µl 患者血清: (最终稀释 1 + 33)
5	反应 室温震荡 30 分钟
6	弃液, 清洗反应条 用 1ml 缓冲溶液室温震荡洗涤 5 分钟 (B)
7	在反应盘的每个孵育槽中加入 1ml 缓冲溶液 (B), 并添加: 检测 IgG: 50µl 结合液 C 检测 IgM: 50µl 结合液 D
8	反应 室温震荡 15 分钟
9	弃液, 清洗反应条 用 1ml 缓冲溶液室温震荡洗涤 5 分钟 (B)
10	加入 0.5ml 底物 (E)
11	反应 室温震荡 10 分钟
12	弃液, 清洗反应条 加入 1ml 缓冲液 (由 B 稀释) 室温震荡 2 分钟
13	弃液, 清洗反应条终止反应 1ml 蒸馏水室温震荡 2 分钟
14	用实验试纸干燥反应条 30 分钟, 读出结果

安全预防

- 仔细遵守操作手册。GA GENERIC ASSAYS GmbH 公司和其授权的经销商不对因擅自更改或修饰操作流程造成的直接或间接伤害负责。
- 请遵守标签上的效期。同样与重组试剂的稳定性相关。
- 禁止混用不同生产批号的试剂。
- 禁止使用其他生产商的试剂。
- 在加样品时注意时间偏差。
- 所有试剂在使用前应该保存在 2-8°C。
- 一些溶液含有少量卡松 (1% v/v) 作为防腐剂。严禁吞咽和与皮肤和黏膜接触。
- 此试剂盒中含有潜在危险的材料, 下列预防措施应该被遵守:
 - 在操作该试剂盒时, 禁止吸烟、饮水、饮食
 - 佩戴防护手套
 - 禁止用嘴吸取任何材料
 - 立刻擦干净溅出物, 使用去污剂清洁被污染的表面
- 在任何情况下, GLP 应适用于使用该试剂盒的所有一般和个别法规。