

AESKULISA – Phospholipid-8Pro-GM

AESKULISA – Phospholipid-8Pro-GM – это твердофазная иммуноферментная система для отдельного качественного определения IgG и/или IgM антител против 8 различных фосфолипидов в человеческой сыворотке. На каждую лунку каждого стрипа планшета отдельно нанесены высокоочищенные человеческие

1. **β -2 Glycoprotein I** – β -2 гликопротеин I
2. **Cardiolipin + β -2 Glycoprotein I** – Кардиолипин + β -2 гликопротеин I
3. **Cardiolipin** – Кардиолипин
4. **Phosphatidyl-choline** – Фосфатидил-холин
5. **Phosphatidyl-ethanolamine** – Фосфатидил-этанолламин
6. **Phosphatidyl-inositol** – Фосфатидил-инозитол
7. **Phosphatidyl-serine** – Фосфатидил-серин
8. **Sphingomyelin** – Сфингомиелин

Клиническая значимость теста

Анти-фосфолипидный синдром (АФС) – это аутоиммунное заболевание с различными клиническими проявлениями, включающими:

- артериальный и венозный тромбозы
- тромбоцитопению
- рецидивирующие аборт
- livedo reticularis
- а также соответствующие **кардиологические, гематологические и неврологические проявления**

В своем самом тяжелом проявлении АФС представляет собой так называемый **катастрофический антифосфолипидный синдром** с диссеминированным образованием тромбов в сосудах различных органов, ведущим к много-органной недостаточности и тромбоцитопении.

На данный момент возможно проведение только симптоматической терапии АФС, которая ограничена анти-коагулянтной терапией.

В противоположность первичному АФС, несвязанному с другими заболеваниями, вторичный АФС связан с различными аутоиммунными заболеваниями, в основном с системной красной волчанкой (СКВ).

Анти-фосфолипидные антитела включают в себя гетерогенную группу аутоантител, первично описанные как антитела против различных отрицательно заряженных фосфолипидов, например кардиолипин. В последнее время выяснилось, что эти антитела оказались антителами против комплексов, состоящих из фосфолипидов и фосфолипид-связанных белков, так называемых протеин-кофакторов.

Первым описанным кофактором был плазменный белок β -2 Glycoprotein I (β -2 GPI), который действует как естественный ингибитор свертывания крови. Другие идентифицированные кофакторы были протромбин, аннексин V, тромбомодулин, протеин C и протеин S. Так как присутствие кофактора β -2 GPI усиливает связывание антител с фосфолипидами, стандартные ИФА (ELISA) тесты обычно покрыты смесью фосфолипидов и β -2 GPI.

В дополнение к роли кофактора в антифосфолипидном связывании, было показано, что как минимум одна часть анти-фосфолипидных антител направлена против только белков и четко связана с тромбозом, типичным для данного заболевания. Таким образом, термин «анти-фосфолипидные» антитела является более историческим, чем точным научным термином.

Диагностика

В связи с известной гетерогенностью антифосфолипидных антител, лабораторная диагностика АФС включает в себя как определение самих анти-фосфолипидных антител, так и коагуляционные тесты для выявления люпус-антикоагулянтов.

Люпус-антикоагулянт, который фактически является смесью анти-фосфолипидных антител, определяется методом, связанным на удлинении времени свертывания.

Два основных серологических параметра для диагностики АФС, анти-кардиолипин и анти- β -2 GPI антитела, были открыты достаточно давно и хорошо изучены.

Однако, по данным ряда работ было доказано, что при определении всего профиля анти-фосфолипидных антител чувствительность и специфичность диагностики АФС значительно увеличивается по сравнению с определением только анти-кардиолипина и анти- β -2 GPI антител.

Анти-фосфолипидный профиль

Рассматривая общее строение мембраны человеческих клеток, основанное на 6 фосфолипидах, очевидна рациональность проведение теста на наличие антител против всех данных фосфолипидов, особенно в связи с тем, что распределение этих фосфолипидов сильно отличается в зависимости от места мембраны в клетке и от типа клетки. В то время как **кардиолипин** находится исключительно на внутренней мембране митохондрий, **фосфатидил-серин** находится преимущественно в мозговой ткани, **фосфатидил-холин** - в печени, а **сфингомиелин** является основным компонентом миелина, который изолирует нервные волокна.

Проведение определения всего спектра 8 анти-фосфолипидных антител позволяет значительно повысить чувствительность и специфичность данного метода ИФА в диагностике АФС, а по типу выявляемых аутоантител также проводить определенную корреляцию с различными клиническими проявлениями АФС.

Антитела к фосфолипидам, являющимися компонентами клеточной мембраны, специфичны против таких фосфолипидов как β -2 Glycoprotein I, Cardiolipin + β -2 Glycoprotein I, Cardiolipin, Phosphatidyl-choline, Phosphatidyl-ethanolamine, Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-serine и Sphingomyelin.

Анти-фосфолипидные антитела часто определяются у больных с системной красной волчанкой (СКВ) и родственными заболеваниями. Наличие анти-фосфолипидных антител у пациентов с СКВ и родственными заболеваниями является типичным проявлением вторичного анти-фосфолипидного синдрома (АФС). При отсутствии аутоиммунных заболеваний, наличие анти-фосфолипидных антител свидетельствует о наличии первичного анти-фосфолипидного синдрома (АФС). Многочисленными исследованиями было доказано наличие связи между наличием данных антител и повышенной частотой встречаемости тромбозов, тромбоцитопении и привычных абортов (как следствие инфаркта плаценты). Точный механизм индуцирования тромбоза определенными анти-фосфолипидными антителами на сегодня не установлен.

Набор содержит:

Концентрированные растворы – необходимо развести (разведенный раствор может храниться как минимум 1 месяц при температуре 4 °С):

1. Буфер для разведения пробы сыворотки – 20 мл (концентрированный х 5) – белая крышечка, желтый раствор
2. Буфер для промывки – 20 мл (концентрированный х 50) – белая крышечка, зеленый раствор

Готовые для применения растворы:

3. Отрицательный контроль – 2,5 мл – зеленая крышечка, желтый раствор
4. Отсекающий контроль – 8 антиген специфических растворов по 1,5 мл (флаконы А – Н) – белая крышечка, желтый раствор
5. Конъюгат IgG – 15 мл – голубая крышечка, голубой раствор
6. Конъюгат IgM – 15 мл – зеленая крышечка, зеленый раствор
7. ТМВ субстрат – 15 мл – черный флакон с черной крышечкой (хранить в защищенном от свете месте)
8. Стоп-раствор – 15 мл – белая крышечка, бесцветный раствор
9. 12 x 8 стрипованных лунок – возможно отламывать любое количество лунок

Для чтения результатов теста необходим Ридер (с читающим фильтром 450 нм и референсным фильтром 620 нм). Промывку желательно проводить с использованием автоматического Вошера.

Условия хранения

Храните все реактивы и планшеты при температуре 2 – 8 °С. Разведенный раствор может храниться как минимум 1 месяц при температуре 4 °С.

Пробы крови

Предпочтительно использовать только что взятую кровь, однако сыворотка может храниться при температуре 2 - 8 °С до 3 дней и при температуре – 20 °С несколько месяцев. Избегайте повторного размораживания и замораживания пробы.

Протокол проведения теста

- Разведите концентрированные растворы:
- 1. Буфер для разведения пробы сыворотки (белая крышечка, желтый раствор) – 1 : 5 - 20 мл буфера плюс 80 мл дистиллированной воды.
- 2. Буфер для промывки (белая крышечка, зеленый раствор) – 1 : 50 - 20 мл буфера плюс 980 мл дистиллированной воды.

При использовании нескольких стрипов планшета разводите соответствующее количество буфера.

- Разведите пробы сыворотки крови разводящим буфером в соотношении 1 : 100 – 10 мкл пробы сыворотки крови плюс 1000 мкл разводящего буфера. Тщательно перемешайте!
- Возьмите требуемое количество лунок для проведения теста и установите на рамку.

Проводите тест по следующей последовательности:

1. Добавьте **100 мкл разведенной сыворотки** каждого пациента в каждую лунку планшета.
2. Добавьте в отдельные лунки по **100 мкл каждого отсекающего контроля** (8 флаконов А – Н), а также **100 мкл отрицательного** контроля. Если IgG и IgM антитела определяются параллельно, контроль и пробы должны ставиться дважды, для каждого класса отдельно.
3. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре (20 – 26 °С).
4. Промойте каждую лунку 3 раза 300 мкл разведенного (1 : 50) промывочного буфера.

При проведении промывки вручную вначале удалите пробы из лунок путем переворачивания планшета и постукивания по промокательной бумаге, затем добавьте 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку, подождите 20 секунд и слейте раствор промывочного буфера. Повторите данную процедуру 3 раза.

5. Добавьте **100 мкл конъюгата** в каждую лунку.
6. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре (20 – 26 °С).

7. Промойте каждую лунку 3 раза 300 мкл разведенного (1 : 50) промывочного буфера.
8. Добавьте **100 мкл ТМВ субстрата** в каждую лунку.
9. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре (20 – 26 °С) в темноте.
10. Добавьте **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку в той же последовательности, в которой добавляли ТМВ субстрат.
11. Инкубируйте **5 минут** как минимум, а затем потрясите планшет 5 секунд.
12. Определите оптическую плотность проб сыворотки крови пациентов, а также положительного, отрицательного и отсекающего контроля на Ридере (при длине волны 450 нм, опция 450.620 нм) в течение ближайших 30 минут.

Сравните оптическую плотность проб сыворотки крови пациентов с оптической плотностью отсекающего контроля. Все пробы с оптической плотностью выше оптической плотности отсекающего контроля считаются положительными.

Для полуколичественной оценки результата теста оптическая плотность пробы сыворотки крови может быть выражена в виде индекса, являющегося отношением оптической плотности пробы сыворотки крови к оптической плотности отсекающего контроля. Чем выше данный индекс, тем более выраженная концентрация определяемых аутоантител в плазме крови пациента.