



Набор ИФА для количественного определения антител к яичниковым тканям человека

Каталог. № : EIA-2937
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 10-2009
Версия 7.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор Anti-Ovarian Ab ELISA – надежный количественный анализ для определения антител к тканям яичников. Материал исследования – сыворотка.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

По данным исследований антитела к овариальным антигенам в сыворотке могут приводить к бесплодию у женщин. Применение ELISA набора для определения овариальных антител рекомендуется для мониторинга нарушений фертильности и преждевременной дисфункции яичников.

3. ПРИМЕНЕНИЕ

Набор Anti-Ovarian Ab ELISA применяется в клинической практике для подтверждения или исключения антител к тканям яичников как причины бесплодия.

4. ПРИНЦИПЫ МЕТОДА АНАЛИЗА

Набор Anti-Ovarian Ab ELISA - это твердофазный иммуноферментный анализ, основанный на принципе «сэндвича» для количественного определения овариальных антител в сыворотке человека. Смесь овариальных белков нанесена на поверхность лунок микропланшеты набора. Образцы и стандарты раскапываются в лунки и инкубируются. Во время инкубации овариальные антитела образца фиксируются на поверхности лунок, связываясь с овариальными белками. После нескольких этапов промывки добавляется ферментный конъюгат, состоящий из поликлональных антител к детерминантам участков Fc иммуноглобулинов человека, ковалентно связанных с пероксидазой хрена. После удаления несвязанного конъюгата путем промывки пероксидаза хрена окисляется добавляемым затем субстратом ТМБ, что приводит к цветовой реакции. Цветовая реакция прекращается посредством добавления серной кислоты (0,25M). Поглощение измеряется при длине волны 450 нм на микропланшетном считывателе. Рекомендуется использовать для референс измерений длину волны более 550 нм.

5. РЕАГЕНТЫ

(достаточно для 96 определений)

1. **Микротитровальные полоски:** (покрыты овариальным антигеном) 96 лунок.
2. **Набор стандартов** (0.5 мл/флакон):
 - Стандарт 1 - 6 Е/мл (бесцветный колпачок)
 - Стандарт 2 - 25 Е/мл (белый колпачок)
 - Стандарт 3 - 50 Е/мл (желтый колпачок)
 - Стандарт 4 - 100 Е/мл (синий колпачок).
3. **Контроль** (зеленый колпачок) равен 15-50 Е/мл – 0,5 мл.
4. **Буфер для разведения** (также используемый как бланк / нулевой стандарт / 0 Е/мл) - 50 мл.
5. **Промывочный раствор** (концентрированный 10x) - 50 мл.
6. **Ферментный конъюгат** (готов к использованию) - 5 мл.
7. **Раствор субстрата** (готов к использованию) - 13 мл.
8. **Стоп раствор** (0,25 моль/л H₂SO₄) - 13 мл.
9. Держатель для отдельных полосок - 1 шт.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНО ТРЕБУЕТСЯ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный считыватель с фильтром 450 нм, выборочно с референтным фильтром ≥ 550 нм.

2. Пипетки со сменными наконечниками (5 мкл, 10 мкл, 50 мкл, 100 мкл, 500 мкл и 1000 мкл).
3. Пробирки для разведения образцов.
4. Дистиллированная или деионизированная вода
5. Абсорбирующая бумага.

Используйте только откалиброванные пипетки и инструменты.

7. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.
2. Избегать контакта со стоп раствором, т.к. он может вызвать раздражения кожных покровов и ожоги.
3. Не раскапывать ртом.
4. Все реагенты считать потенциально инфицированными. Обращаться с реагентами с максимальной осторожностью.
5. Работа с реагентами и их утилизация должны производиться в соответствии с принятыми мерами предосторожности и правилами, если таковые существуют.

8. УКАЗАНИЯ ПО ПОДГОТОВКЕ РЕАГЕНТОВ

1. Компоненты набора используются в комплекте. Компоненты разных наборов не следует смешивать, или использовать одновременно.
2. Все реагенты необходимо довести до комнатной температуры перед использованием.
3. Все реагенты следует смешивать без вспенивания.
4. Начала постановке анализ должен проводиться поэтапно и непрерывно.
5. Все реагенты и образцы следует раскапывать на дно лунок. Не требуется вортекс-смешивания после пипетирования.
6. Для каждого образца использовать новый одноразовый наконечник.
7. Перед началом исследования рекомендуется подготовить реагенты сняв с них колпачки и установив стрипы в держатель.
8. Для получения оптимального результата важно хорошо промыть лунки после инкубации и полностью удалить остатки влаги из лунок.
9. Т.к. кинетика ферментативной реакции зависит от окружающей температуры, могут наблюдаться различные степени поглощения при соответствующей температуре в рабочем помещении. Оптимальная температура воздуха в лаборатории - 20-22°C.
10. Рекомендуется ставить все реагенты в дублях.

9. УКАЗАНИЯ ПО ХРАНЕНИЮ И ДАННЫЕ ПО СРОКУ ГОДНОСТИ

1. Хранить реагенты при 2-8°C.
2. Реагенты остаются стабильными до конца срока годности набора.
3. Разбавленный промывочный раствор стабилен 4 недели при температуре холодильника (2-8°C).
4. Сразу после использования закройте флаконы их колпачками.
5. Храните микротитровальные в сухом пакете с осушителями. Неиспользованные полоски необходимо хранить в плотно закрытом пакете с осушителями. При соблюдении этих условий хранения они остаются стабильными по крайней мере 4 недели после вскрытия герметичного пакета.

10. МАТЕРИАЛ ОБРАЗЦА

Сыворотка.

11. ЗАБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Отобрать кровь венепункцией, дать свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Избегать гемолиза. Избегать повторного замораживания. Хранить пробирки закрытыми во избежание контаминации или изменения концентрации.

1. При работе с образцами соблюдать осторожность, т.к. они могут быть инфицированы.
2. Нет сведений о влиянии внешних факторов или других субстанций.
3. Образцы могут храниться в пределах следующих температур:
 - до 30 °C до трех дней;
 - в холодильнике (2 до 8°C) – до одной недели;
 - в морозильнике (-10 до -20°C) – до 1 года.

ВНИМАНИЕ! Т.к. не существует метода анализа, дающего полную уверенность в отсутствии веществ содержащих ВИЧ или вируса гепатита В или других инфекционных агентов, все продукты человеческой крови, включая образцы пациентов, должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Довести все реагенты до комнатной температуры и тщательно смешать перед использованием.
2. Приготовление промывочного раствора (10х):
Содержимое флакона с концентрированным промывочным раствором (50 мл) необходимо развести 450 мл дистиллированной или деионизированной воды. **Внимание:** НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ неочищенную водопроводную воду!
3. Развести сыворотку пациента 1:100 буфером для разведения (соотношение 1:100 = 5 мкл сыворотки + 495 мкл буфера).
4. Поместить желаемое кол-во полосок в держатель.
5. Раскапать по 50 мкл стандартов в назначенные лунки.
6. Раскапать по 50 мкл разведенной сыворотки образцов (с новыми одноразовыми наконечниками) в назначенные лунки.
7. Инкубировать 60 мин при 37°C.
8. Резко встряхнуть инкубационный раствор. Промыть лунки 3 раза 150 мкл промывочного раствора.
9. Полностью удалить промывочный раствор.
10. Раскапать по 50 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
11. Инкубировать 60 мин. при 37°C.
12. Удалить инкубационный раствор, промыть лунки 5 раз 150 мкл разведенного промывочного раствора
13. Удалить остатки раствора, постучав перевернутым планшетом над абсорбирующей бумагой.
14. Добавить по 50 мкл раствора субстрата в каждую лунку немедленно после промывки.
15. Инкубировать микротитровальные лунки 30 мин. при комнатной температуре.
16. Остановить ферментативную реакцию добавлением 50 мкл стоп раствора в каждую лунку в той же последовательности, что и раствор субстрата.
17. Определить абсорбцию каждой лунки при длине волны 450 нм при помощи микропланшетного считывателя. Рекомендуется считать абсорбцию в течение 10 минут после остановки реакции.

Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре. Это делает возможной интерполяцию, при наличии постоянных физико-химических условий. Т.к. при каждой постановке исследуются калибраторы, колебания абсорбции не влияют на абсолютный результат.

13. СХЕМА ПИПЕТИРОВАНИЯ

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|---|----|---|----|---|----|---|----|----|----|
| A | бланк | бланк | P | 3 | P | 11 | P | 19 | P | 27 | P | 35 |
| B | S | 1 | P | 4 | P | 12 | P | 20 | P | 28 | P | 36 |
| C | S | 2 | P | 5 | P | 13 | P | 21 | P | 29 | P | 37 |
| D | S | 3 | P | 6 | P | 14 | P | 22 | P | 30 | P | 38 |
| E | S | 4 | P | 7 | P | 15 | P | 23 | P | 31 | P | 39 |
| F | P | C | P | 8 | P | 16 | P | 24 | P | 32 | P | 40 |
| G | P | 1 | P | 9 | P | 17 | P | 25 | P | 33 | P | 41 |
| H | P | 2 | P | 10 | P | 18 | P | 26 | P | 34 | P | 42 |

В данной схеме пипетирования рекомендуемые позиции для бланков (используется буфер для разведения), стандартов (S1-S4), положительного контроля (PC) и образцов пациентов (P1-P42) показаны как при исследовании в дублях.

14. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитать среднюю абсорбцию каждого набора референс-стандартов, контролей, и образцов пациентов.
2. Значения оптических плотностей каждого стандарта откладываются на оси Y. Соответствующие уровни овариальных антител откладываются на оси X. Итоговая калибровочная кривая используется для определения уровня антител в образцах пациентов. Значения ОП образцов сыворотки соотносятся с соответствующими концентрациями антител посредством интерполяции. Следует использовать 4-параметровую подборку (сигмоид).

3. Используя средние значения абсорбции каждого образца определить концентрацию овариальных антител в Е/мл по стандартной кривой.

15. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

- При температуре более 30°C образцы необходимо хранить охлажденными. Время остановки ферментативной реакции можно изменять (уменьшать).
- Не использовать гемолизные или липоидные сыворотки пациентов с заболеваниями печени. Определенные патологические состояния могут повлиять на результат, такие как поли- и моноклональные гаммапатии, аутоиммунные заболевания или измененный иммунный статус.

16. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения в норме: 0-10 Е/мл;
Повышенные значения: более 10 Е/мл.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: +38 (0342) 77 51 22
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua