

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

5450201, TECHNOZYM® vWF: Ag ELISA

Каталог. № : 5450201
Количество : 96
Производитель: **Technoclone**,
(Австрия)

Методика от 01-2012



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ОПИСАНИЕ

Фактор Виллебранда (vWF) это большой, многофункциональный гликопротеин, занимающий ключевую позицию в первичном гемостазе. Он имеет мультимерную структуру с несколькими функциями:

- Он является несущим белком для фактора VIII в плазме, он образует комплексы и таким образом предохраняет фактор VIII от преждевременного протеолитического расщепления.
- Он действует как медиатор агрегации тромбоцитов путем взаимодействия с мембранными рецепторами тромбоцитов (GP Ib и GP IIb/IIIa) вслед за предшествующей активацией тромбоцитов.
- Он играет важную роль в первичном гемостазе, т.к. необходим для адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным тканям в местах повреждения сосудистой стенки.

Болезнь Виллебранда (vWS) одна из самых распространенных геморрагических заболеваний; она может быть как наследственной, так и приобретенной, ее причиной являются количественные или качественные изменения vWF. Определение vWF антигена является важной частью диагностики. Набор vWF: Ag ELISA позволяет дифференцировать гемофилию А и болезнь Виллебранда, а также результаты анализа могут использоваться как дополнительные для диагностики циррозов и сосудистых заболеваний.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

(Для 96 тестов)

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых поликлональными антителами против vWF. Поставляется в пакете из алюминиевой фольги с осушителем.
2. Буфер промывочный, концентрат, (PBS; pH 7,3); содержит детергент; 0,01% мертиолат; 1 флакон 80 мл.
3. Буфер для инкубации (PBS; pH 7,3); содержит стабилизированный белок; 0,05% проклин; краситель, 1 флакон 90 мл, готов к использованию.
4. Калибраторы (Стандарты), пронумерованные; лиофилизированные, по 1 флакону каждого.
Концентрации зависят от лота. Точная концентрация указана на этикетке флакона.
5. Контрольные плазмы низкого и высокого уровней для целей проверки, лиофилизированные; по 1 флакону каждой.
Концентрации зависят от лота. Точная концентрация указана на этикетке флакона.
6. Конъюгат поликлональных антител анти-vWF-POX; окрашен в голубой цвет; 1 флакон 0,3 мл.
7. Хромоген ТМБ (тетраметилбензидин); 1 флакон, 12 мл; готов к использованию.
8. Стоп-раствор (0,45 моль/л серная к-та); 1 флакон 12 мл; готов к использованию.
9. Адгезивная пленка для заклеивания стрипов (2).

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (не поставляемые)

1. Дистиллированная вода
2. Пробирки для разведения стандартов и образцов
3. Мерные цилиндры (1000 мл)
4. Пипетки (10, 100 и 1000 мкл)
5. Пипетки переменного объема (1000 мкл)
6. Многоканальные пипетки или дозаторы (100 и 200 мкл)
7. Устройство для автоматического промывания микропланшетов или мультисистемная пипетка
8. Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм и (желательно) длиной волны сравнения 620 нм
9. Инкубатор (37 °C)

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Со всеми образцами крови или плазмы человека и реагентами, содержащими материалы человеческого происхождения следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. Они должны обрабатываться с соблюдением соответствующих мер предосторожности и со строгим соблюдением мер безопасности, принятых в лаборатории. Правила по уничтожению такие же, как и при уничтожении клинических отходов.

- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, были протестированы методами, одобренными FDA, на HBsAg, HIV 1/2 Ab и HCV Ab и дали отрицательный результат (см. указания на этикетке флакона).

- Стоп-раствор (серная кислота) может раздражать кожу. При попадании в глаза, немедленно промойте с большим количеством воды и обратитесь к доктору.

- Иногда реагенты содержат консерванты (мертиолат). Не проглатывать! Избегать контакта с кожей и слизистой.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Срок годности, указанный на этикетках флаконов, относится к хранению не вскрытых реагентов.

Стабильность компонентов после вскрытия, растворения и/или разведения можно узнать из таблицы, приведенной ниже.

При необходимости образцы, контроли и калибраторы могут быть повторно заморожены/разморожены до 5 раз. Но рекомендуется делать аликвоты.

Материал/реагент	состояние	хранение	стабильность
Калибраторы, контрольные плазмы	После растворения	- 20 °C	6 месяцев
Стрипы	После вскрытия пакета	Комнатная температура 2 ... 8 °C при хранении в пластиковом пакете с осушителем	8 часов
			Срок годности указанный на наборе
Буфер промывочный, концентрат	После вскрытия	2 ... 8 °C	6 месяцев
Буфер промывочный	разведения 1+9	2 ... 8 °C	3 недели
Буфер для инкубации	После вскрытия	2 ... 8 °C	2 месяца
Конъюгат	После вскрытия	2 ... 8 °C	6 месяцев
	Рабочий раствор	Комнатная температура	60 минут
Хромоген ТМБ	После вскрытия	2 ... 8 °C	Срок годности указанный на наборе

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Материал образцов: Плазма.

Получение плазмы: смешайте 9 частей венозной крови с 1 частью цитрата натрия (0,11 моль/л) и центрифугируйте 15 минут со скоростью не менее 2500 g (DIN 58905). Образцы плазмы могут храниться 3 часа при комнатной температуре; для более длительного хранения образцы необходимо заморозить немедленно после центрифугирования. Замороженные при -20°C образцы стабильны 6 месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-25°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
2. Приготовление буфера для промывок: Разбавьте 1 часть (по объему) концентрата буфера для промывок 11.5 частями (по объему) дистиллированной воды (1+11.5). Хорошо перемешайте! (Разведенный концентрат буфера для промывок = буфер для промывок). В буфере могут образовываться кристаллы, которые растворяются при 37°C в течение 10 минут.
3. Растворение Калибраторов и контрольных образцов плазмы: калибраторы и контрольные плазмы растворяют в 500 мкл дистиллированной воды и перемешивают через 10 секунд после растворения в течение 15 минут на вортексе. Растворенные компоненты чуть мутноватые.

- Разведение калибраторов, контрольных образцов плазмы и образцов плазмы пациентов (1+25): Разведите 10 мкл образцов, 10 мкл калибраторов и 10 мкл контролей в 250 мкл (каждый) буфера для инкубации. Перемешайте в течение 10 секунд!
- Приготовление рабочего раствора конъюгата (1+50): Разбавьте 1 часть (по объему) конъюгата 50 частями (по объему) инкубационным буфером.

Для 8 лунок: Смешайте 20 мкл конъюгата с 1000 мкл инкубационного буфера.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Инкубация с образцами и конъюгатом (см. примечание 1,2)	Внесите разведенные калибраторы, разведенные контроли и разведенные образцы в лунки	50 мкл
	Внесите рабочий раствор конъюгата в лунки, закройте лунки пленкой	50 мкл
	Инкубируйте при температуре = 37°C	45 минут
Промывка (см. описание 1,3,4)	буфер для промывок	3 x 200 мкл
Реакция с субстратом (см. описание 1,2)	Внесите раствор субстрата в лунки, закройте лунки пленкой	100 мкл
	Инкубируйте при комнатной температуре	15 минут
Остановка реакции (см. описание 1,2)	Внесите стоп-раствор в лунки	100 мкл
Измерение (см. описание 5)	Микропланшетный анализатор, 450 нм	встряхивать 10 секунд, измерить в течение 10 минут

Комнатная температура составляет 20...25°C.

Ссылки:

- Не смешивайте реагенты из различных наборов.
- Точность и воспроизводимость кроме других факторов, в большой степени зависят от:
 - Тщательного перемешивания всех компонентов, используемых для приготовления разведения.
 - Анализа калибраторов, контролей и образцов в дублях.
 - Инкубация должна проводиться при правильной температуре.
 - Строгого соблюдения порядка и скорости внесения реагентов, и соблюдения указанных временных интервалов.
 - Время инкубации образцов, реакции с конъюгатом и субстратом, указанное в методике, отсчитывается от внесения компонента в последнюю лунку. Время инкубации не может различаться более, чем на 10%.
 - В процессе инкубации образцов и реакции с конъюгатом время внесения разведенных калибраторов/ образцов/ контрольных образцов плазмы и/или раствора конъюгата не должно превышать 60 секунд на одну полоску (8 лунок).
 - Во время реакции с субстратом и при остановке реакции, время, необходимое для внесения субстрата и/или стоп- раствора не должно превышать 10 секунд на одну полоску. Использование многоканальных пипеток или диспенсеров облегчает соблюдение временных правил.
- Пометьте/пронумеруйте стрипы водостойким маркером, на тот случай, если стрипы случайно выпадут из рамки- держателя во время тестирования.
- После последней промывки жидкость из лунок должна быть тщательно удалена, микропланшет перевернут и положен на фильтровальную бумагу. Аккуратно постукивая, удалите последние оставшиеся в лунках капли.
- При измерении разницы между ОП при двух длинах волн 450 и 620 нм или 450 и 690 нм, правильность результатов возрастает.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Сниженный уровень vWF: Ag ассоциируется с группой крови 0. На уровень vWF: Ag также влияют физические упражнения, беременность, использование оральных контрацептивов,

принадлежность к определенной этнической группе, а также уровень антигена повышается с возрастом.

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

Расчет результатов

Построение калибровочной кривой:

Ось X: концентрация vWF: Ag Ед/мл (1Ед/мл = 100%)

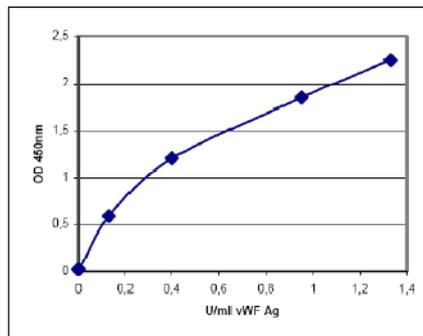
Ось Y: абсорбция

Графопостроитель является линейным с использованием линейной системы координат построением от точки к точке.

Оценка калибровочной кривой:

- Значение абсорбции наибольшего стандарта должно лежать в интервале 1,0 – 2,5.
- Достоверность данного теста может быть оценена при расчете значений для контрольных образцов плазмы.

Пример калибровочной кривой:



Измерение концентраций в образцах:

- Определите концентрацию непосредственно из калибровочной кривой.
- Если есть образцы, значение абсорбции для которых выше, чем значение самой высокой точки калибровки, они должны быть предварительно разведены буфером для инкубации (1+1). При этом полученная в результате измерения концентрация должна быть умножена на коэффициент разведения 2.

ДИАПАЗОН НОРМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Диапазон нормальных значений vWF: Ag определен как 0,5 –1,5 Ед/мл (50 – 150%). Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Для калибровки стандартов данного набора были использованы калибровочные материалы WHO Международного стандарта для фактора VIII коагуляции крови и фактора Виллебранда в плазме (человека).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com