

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛАСТАЗЫ-1

BS-86-02, Pancreatic Elastase ELISA

Каталог. № : BS-86-02

Методика от 17-01-2012

Количество : 96

Производитель: Bioserv
Diagnostics, (Германия)



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

BIOSERV PankrinTM - ELISA – иммуноферментный анализ для количественного определения эластазы-1 в сыворотке у пациентов с абдоминальными болями с целью диагностики острого панкреатита или обострения хронического панкреатита.

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Острый панкреатит – ферментативное воспалительное поражение поджелудочной железы (ПЖ), вызванное дистопической активацией протеаз в клетках ацинуса ПЖ, обструкцией выводящих протоков ПЖ и образованием межклеточных вакуолей (Schneider 1999). Ежегодно регистрируется от 50 до 100 случаев на 100000 человек. Клиническая картина определена выраженной болью в брюшине и общими симптомами, такими как тошнота, рвота и циркуляторный коллапс (Selberg и другие 1995), другими словами, заболевание не имеет четкой клинической картины. Умеренная форма острого панкреатита - интерстициальный панкреатит (приблизительно 80% всех случаев острого панкреатита) протекает без осложнений, и при адекватной терапии клинические проявления отека железы обычно исчезают в пределах 72 часов. Тяжелая форма острого панкреатита –инфильтративно-некротический панкреатит, характеризуется некрозом и вовлечением в патологический процесс жизненно важных органов. Клинически проявления некроза держатся длительно(3-4 недели) (Asanuma и другие, 1999, Singer и другие 1988). Морфологически инфильтрат в ПЖ и нечеткое определение границ ПЖ могут наблюдаться вместе с отёком паранефральной области. Главная причина острого панкреатита - увеличенное потребление алкоголя (Blank *et al.* 1999, Lankisch 2000) и закупорка желчными камнями, которые могут попадать в панкреатические протоки в результате рефлюкса (Niederau и другие 1997, UHL и другие 1999, Sharma и другие 1999). Другие патогенетические факторы встречаются реже. У значительного числа пациентов с острым панкреатитом никакие факторы риска не обнаруживаются. Холелитиаз (желчекаменная болезнь) максимально диагностируется между 40 и 60 годами, алкогольное поражение ПЖ - между 20 и 40 годами.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

В функциональной диагностике экзокринной функции ПЖ BIOSERV PankrinTM - ELISA – чувствительный и технически доступный тест, идеально дополняющий ультразвуковой метод на начальном этапе диагностики.

ПРИНЦИП МЕТОДА

BIOSERV PankrinTM – высокоспецифичен для панкреатических белков. Заметим, что в отличие от методов клинической химии, где тесты основаны на определении ферментативной активности, BIOSERV PankrinTM определяет панкреатические белки иммунологически. И в этом случае иммунологические свойства определяются молекулярной структурой, а, следовательно, метод не только высокоспецифичен для ПЖ, но также возможно определение уже инактивированных ферментов в сыворотке. В результате панкреатические белки, попадающие в кровь во время острого панкреатита, могут определяться в сыворотке в течение более долгого периода по сравнению с методами клинической химии, основанными на определении только ферментативной активности. BIOSERV PankrinTM - твёрдофазный иммуноферментный анализ, основанный на двойной сэндвич-технологии. Планшет покрыт поликлональными антителами, специфично распознающими панкреатические белки. Панкреатические белки, содержащиеся в образцах и стандартах, связываются с антителами во время инкубации с иммобилизацией на планшете. Затем добавляются вторые поликлональные антитела, которые будут связываться с уже иммобилизованными панкреатическими белками. В следующем

шаге инкубации биотинилированные антитела связываются для визуализации с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Образовавшийся пероксидаза-стрептавидиновый комплекс ферментативно окисляется субстратным раствором ТМБ. Ферментная реакция останавливается через определенное время добавлением раствора серной кислоты (0,25 моль/л). Концентрация окисленного ТМБ измеряется фотометрически на длине волны 450 нм.

РЕАГЕНТЫ (на 96 определений)

1. Стандарты лиофилизированные во флаконах по 0,5 мл: Стандарт 1 (100 Pankrin TM -Ед/мл сыворотки - прозрачная крышка); Стандарт 2 (200 Pankrin TM -Ед/мл сыворотки - белая крышка); Стандарт 3 (400 Pankrin TM -Ед/мл сыворотки - жёлтая крышка); Стандарт 4 (800 Pankrin TM -Ед/мл сыворотки - голубая крышка)	
2. Положительный контроль лиофилизированный (содержит 200 Pankrin TM -Ед/мл сыворотки ± 20%, т.е. 160-240 Ед/мл) зелёная крышка	0,5 мл каждый
3. Биотинилированные вторые поликлональные анти - панкреатические белки антитела (красная крышка)	0,12 мл
4. Буфер для разбавления биотинилированного конъюгата	8 мл
5. Стрептавидин-пероксидазный конъюгат (готов для использования)	8 мл
6. Промывочный Буфер/Разбавитель образцов, концентрат 10x	2 x 50 мл
7. Субстратный раствор (ТМБ) (готов для использования)	13 мл
8. Стоп-раствор, 0,25 моль/л серной кислоты (готов для использования)	13 мл
9. Стрипы, покрытые поликлональными антителами к панкреатическим белкам	96 ячеек
10. Рамка для стрипов	1

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм, опционно с фильтром ≥550 нм.
2. Дозаторы с наконечниками (5, 50, 100 и 1000 мкл).
3. Пробирки для разбавления образцов.
4. Дистиллированная или деионизированная вода.
5. Фильтровальная бумага.
6. Пожалуйста, используйте только калиброванные пипетки и инструменты.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор предназначен только для диагностики *in-vitro*.
2. Избегайте контакта стоп-реагента с кожей: этот реагент является раздражающим и обжигающим кожу веществом.
3. Не пипетируйте реагенты ртом.
4. Пожалуйста, обращайтесь с образцами с предосторожностями как с потенциально инфекционным материалом.
5. Утилизируйте отходы в соответствии с национальными руководствами по биологической безопасности.

ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

1. Компоненты набора разработаны для использования как единое целое. Не используйте компоненты из других наборов.
2. Все реагенты и образцы должны достигнуть комнатной температуры (18-25°C) перед использованием.
3. Все реагенты необходимо перемешивать, не допуская образования пены.
4. Не прерывайте последовательность операций при выполнении начатого анализа, работайте без задержек.
5. Вносите реагенты и образцы на дно ячеек. Встряхивания ячеек после внесения реагентов не требуется.
6. Используйте новый одноразовый наконечник для каждого образца.
7. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки с флаконов, поместить стрипы в держатель, что обеспечит примерно одинаковые промежутки времени между каждым пипетированием без задержки.

- Для оптимальных результатов тщательная промывка принципиальна: удалите остатки жидкости после промывки, опрокидывая планшет на фильтровальную бумагу.
- Так как кинетика используемой ферментной реакции зависит от окружающей температуры, экстинкция коррелирует с комнатной температурой. Оптимальная температура 20-22 °С.
- Рекомендуется выполнять исследование в дублях для уменьшения ошибки пипетирования.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ И СРОКУ ГОДНОСТИ

- Набор храните при температуре 2-8 °С.
- Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
- Разведенный промывающий раствор стабилен в течение 4 недель при температуре 2-8 °С.
- Разведенный экстракционный буфер может храниться при 2-8 °С на протяжении 4 недель.
- Закрывайте флаконы с реагентами сразу после использования.
- Храните стрипы микропланшета в пакете с осушителем. Оставшиеся неиспользованными стрипы также храните в плотно закрытом пакете с осушителем. При соблюдении данных условий стрипы стабильны не менее 4 недель после первого использования.

ОБРАЗЦЫ

Сыворотка

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Соберите кровь обычной венопункцией, позвольте ей свернуться и отделите центрифугированием при комнатной температуре, избегайте гемолиза. Избегайте повторного замораживания-размораживания. Храните пробирки закрытыми для предотвращения контаминации и разрушения образца.

- Обращайтесь с образцами как с инфекционно опасными.
- Неизвестна интерференция с внешними факторами: лекарства, диета, другие вещества.
- Образец остается стабильным при хранении:
 - до 30 °С в течение 3 дней,
 - при 2-8 °С в течение 7 дней,
 - при замораживании до -18 - -20 °С хранится до 1 года.

Внимание! Не существует методов, гарантирующих отсутствие любых инфекционных агентов, включая вирус гепатита В, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV) в реагентах этого набора. Следовательно, все биологические образцы человеческого происхождения, в том числе образцы фекалий, необходимо считать потенциально инфекционно опасными.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Подготовка Промывочного Буфера (10 x концентрация): Концентрированный промывочный раствор (50 мл) разбавить с 450 мл дистиллированной или деионизированной воды. **Внимание:** Не использовать воду из-под крана!
- Приготовление лиофилизированных стандартов: Растворите каждый стандарт в 500 мкл дистиллированной воды. Не используйте буфер! Разведенные стандарты могут храниться при температуре 2 - 8 °С до 4-х недель.
- Все реагенты и образцы привести к комнатной температуре перед использованием.
- Установить требуемое число сорбированных антителами стрипов в рамку. Покройте бумагой рабочее место. Используйте оставшиеся стрипы в течение 2-х недель.
- Сыворотку необходимо развести 1:101 Промывочным Буфером (например, 25 мкл супернатанта добавить в 2,5 мл Промывочного Буфера). Перемешать. Разведенные стандарты готовы для использования.
- Добавить по 50 мкл Промывочного Буфера (в лунку, предназначенную для нулевого стандарта), стандарты, положительный контроль, и разведенные образцы сыворотки в соответствующие лунки, используя одноразовые наконечники.
- Инкубировать 60 минут при комнатной температуре.
- Энергично встряхнуть реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл Промывочным Буфером.
- Встряхнуть остатки воды из ячеек, постучав по рамке перевернутого на фильтровальную бумагу планшета.
- Развести биотинилированные антитела к панкреатическим белкам в соотношении 1:201 (1 часть биотинилированных антител + 200 частей Буфера для разбавления биотинилированного конъюгата из расчета:

Раствор анти-панкреатического протеинового антитела, мкл	Биотинилированный конъюгатный буфер, мл
5	1
10	2
15	3
25	5

- Перемешать. Раствор готов для использования. Добавить 50 мкл разведенных биотинилированных антител в каждую лунку.
- Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
 - Удалить реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл Промывочным Буфером.
 - Встряхнуть остатки воды из ячеек, постучав по рамке перевернутого на фильтровальную бумагу планшета.
 - Добавить 50 мкл стрептавидин-пероксидазного конъюгата (готов для использования) в каждую лунку.
 - Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
 - Удалить реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл Промывочным Буфером.
 - Встряхнуть остатки воды из ячеек, постучав по рамке перевернутого на фильтровальную бумагу планшета.
 - Добавить 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку.
 - Инкубировать 20 минут при комнатной температуре (**Внимание:** заметьте время после добавления субстратного раствора в первую лунку).
 - Остановить ферментную реакцию добавлением 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку в той же последовательности и с той же скоростью, что и субстратный раствор.
 - Измерить оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм в течение 10 минут после остановки реакции.

Общее свойство всех ферментных реакций – линейная зависимость от времени и температуры. Это делает возможным интерполяцию для конкретных физико-химических условий.

Если абсорбция Стандарта 800 Ед/мл ниже 1,0 Ед ОП, время инкубации с субстратом можно увеличить.

И, наоборот, если абсорбция Стандарта 800 Ед/мл выше предела измерения фотометра, время инкубации с субстратом можно сократить. Если стандарты ставятся в каждой серии анализа, колебания оптической плотности не влияют на абсолютные результаты.

СХЕМА ПИПЕТИРОВАНИЯ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	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 этой схеме пипетирования рекомендованные позиции для "blank" (нулевой стандарт), стандарты (S1-S4), положительный контроль (PC), и для образцов пациентов (P1-P42) показаны в двойном определении.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

- Подсчитать средние значения оптической плотности всех стандартов, контролей и образцов.
- По оси (Y) откладывается оптическая плотность каждого стандарта, а по оси (X) соответствующая концентрация стандарта эластазы-1.
- Используйте оптическую плотность каждого образца для расчета концентрации по стандартной кривой.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- При температуре выше 30°C образцы необходимо транспортировать в холодильнике. Время остановки ферментной реакции необходимо настроить (сократить).
- Нельзя использовать сильно гемолизированные или липемические образцы от пациентов с заболеваниями печени. На результаты могут неблагоприятно повлиять определённые патологические состояния, например, поли- и моноклональная гаммапатия, аутоиммунные заболевания или нарушения иммунного статуса.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

	Концентрация, PanIN TM -Ед/мл сыворотки
Норма	0 – 175
Патология	> 175

Эти диапазоны были определены у 558 здоровых доноров крови и 117 пациентов с клиническим диагнозом со специфичностью 96% и чувствительностью 98%. Если получено значение, близкое к cut-off значению, мы рекомендуем повторное определение с новым образцом сыворотки, взятым в пределах 24 часов до проведения анализа.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

1. Диагностическая Специфичность: 96%

Были исследованы образцы от 558 лиц. Они были либо здоровыми донорами крови, либо пациентами, у которых различные заболевания поджелудочной железы были исключены с помощью других диагностических методов.

2. Диагностическая Чувствительность при хроническом панкреатите: 98 %

Исследовались образцы от 177 пациентов, страдающих острыми панкреатитами.

3. Внутрисерийный коэффициент вариации 7,48% (5,07-9,10%)

Были использованы 6 наборов 6 разных лотов (произведённых в разные дни). Один образец пациента (оптическая плотность примерно 1,0 Ед ОП) определялся 96 раз в этой процедуре.

4. Межсерийный коэффициент вариации 6,51% (5,40-8,70%)

Для определения коэффициента вариации между сериями был использован один стрип (8 ячеек) каждого из 12 наборов 6 разных лотов (произведённых в разные дни). Один образец пациента (оптическая плотность примерно 1,0 Ед ОП) определялся 72 раза в этой процедуре.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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