



Набор ИФА для определения циркулирующего иммунного комплекса (ЦИК)

Каталог. № : EIA-3986
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 09-2009

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

ПРОСЬБА ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО ТЕКУЩУЮ ВЕРСИЮ ИНСТРУКЦИИ, ПОСТАВЛЯЕМУЮ С НАБОРОМ.

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный колориметрический метод для качественного определения концентрации IgG-ЦИК в сыворотке и плазме.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

3. ПРИНЦИП

C3-фиксирующие циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) сначала блокируются антителом к C3, иммобилизованным на микропланшете. Затем для количественного определения IgG-ЦИК комплексов применяется определенное конъюгированное пероксидазой антитело к IgG и H₂O₂-ТМБ в качестве ферментного субстрата. Объемы образовавшегося продукта вследствие ферментативной реакции, которые измеряются путем считывания поглощения при длине волны 450 нм, являются пропорциональными уровням комплексов IgG-ЦИК в твердой фазе.

4. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

4.1 Реагенты и материалы поставляемые в наборе

(достаточно для 96 определений)

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Инкубационный буфер | (1 флакон) 27 мл 100 мМ боратный буфер, pH 7,4, 10 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА); |
| 2. Конъюгат | (1 флакон) 0,75 мл (анти-IgG-пероксидазный конъюгат); |
| 3. Конъюгатный буфер | (1 флакон) 25 мл (100 мМ боратного буфера, pH 7,4, 10 г/л БСА); |
| 4. Привитый микропланшет | (1 микропланшет с делимыми лунками) стрипы покрыты анти-C3 (Fab') ₂ |
| 5. ТМБ-субстрат | (1 флакон) 12 мл H ₂ O ₂ -ТМБ 0,25 г/л (избегать любого контакта с кожей); |
| 6. Стоп-раствор | (1 флакон) 12 мл H ₂ SO ₄ 0,15 М (избегать любого контакта с кожей). |

4.2 Требуемые, но не поставляемые реагенты

0,9% раствора хлорида натрия (физиологический раствор)

4.3 Вспомогательные материалы и оборудование

Автоматический дозатор.
Микропланшетный ридер.
37°C инкубатор.

Внимание:

- Все реагенты и микропланшет должны храниться при 2-8°C в темноте и использоваться до указанной на упаковке даты.
- Оставьте микропланшет при комнатной температуре на несколько минут, перед тем как достать необходимое для анализа число стрипов.
- Поместите неиспользованные стрипы в пакет для хранения и герметично закройте его лентой.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Сыворотки контрольных пациентов могут храниться при – 20°C в течение несколько месяцев.
- Образцы должны вноситься маленькими аликвотами (50 мкл) и размораживаться только однажды.
- Не использовать лиофилизированную сыворотку или объединенные сыворотки в качестве контролей.
- Обращаться одинаково с контролем и с образцами сывороток.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Подготовка конъюгата

Разбавить концентрированный конъюгат (реагент 2) 1 / 20 конъюгатом буфера (реагент 3).

Например, 100 мкл концентрированного конъюгата может быть разбавлено до 2 мл конъюгированным буфером. Хорошо перемешайте и избегайте вспенивания.

Реагенты стабильны до трех часов при комнатной температуре.

6.2 Подготовка образца

Анализ ЦИК может быть произведен как с сывороткой, так и с плазмой. Образцы, не задействованные сразу, должны храниться при – 20°C. Их нельзя размораживать более 1 раза.

Пипетировать в пробирку для анализа:

Сыворотку/плазму	25 мкл
Инкубационный буфер (реагент 1)	500 мкл

Перемешать осторожно миксером.

6.3 Процедура

Поскольку постановку необходимо проводить в дублях, каждое определение должно также в себе включать две лунки для каждого образа, две лунки для любого контроля и две лунки для бланка.

Внести:

	Образец/Контроль	Бланк
Разведенная сыворотка/плазма	100 мкл	-
Инкубационный буфер (реагент 1)	-	100 мкл

Инкубировать при 37°C 30 минут.

Удалить содержимое каждой лунки.

Промыть 3 раза каждую лунку 300 мкл физраствора. Позвольте оставшейся жидкости адсорбироваться на промокательной бумаге путем переворачивания на ней планшета.

Внести в каждую лунку:

	Образец/Контроль	Бланк
Разбавленный конъюгат	100 мкл	100 мкл

Инкубировать при 37°C 30 минут.

Удалить содержимое каждой лунки.

Промыть 3 раза каждую лунку 300 мкл физраствора. Позвольте оставшейся жидкости адсорбироваться на промокательной бумаге путем переворачивания на ней планшета.

Внести в каждую лунку:

	Образец/Контроль	Бланк
ТМБ-субстрат	100 мкл	100 мкл

Инкубировать при комнатной температуре 22+28°C 15 мин.

Внести:

	Образец/Контроль	Бланк
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл

Считать абсорбцию при 450 нм относительно бланка в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Следует отметить, что подходящего параметра для сравнения концентраций ЦИК пока нет. В общем, для сравнительных целей решено использовать концентрацию IgG комплекса, который, как и ЦИК может сочетаться с комплементом.

Однако есть несколько ограничений в использовании IgG комплекса для получения уровня ЦИК:

- Может быть посчитан только ЦИК, содержащий IgG (процедура не может быть подстроена под IgA, IgM или IgE-содержащие ЦИК);
- IgG-комплексы не стабильны;
- Продукты термической обработки могут не дать результатов.

В виду данных обстоятельств было предложено использовать более пригодный контроль, представленный в группе здоровых доноров. Скрининга 15-20 людей достаточно для получения значений «нормального диапазона». Вариации результатов разных постановок (между анализами) могут быть ликвидированы использованием при каждой постановке дублей 5-6 контрольных образцов.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

8.1 Проведение анализа

Образцы, которые являются загрязненными микробиологически, не должны быть использованы в анализе.

Высоко липемические или гемолизированные образцы не следует также использовать.

Важно, чтобы время реакции в каждой лунке было постоянным для получения воспроизводимых результатов.

Внесение растворов образцов не должно выходить за десять минут, чтобы избежать смещения процедуры анализа. Если используется больше чем один планшет, рекомендуется повторить кривую реакции дозы.

Добавление раствора субстрата вызывает кинетическую реакцию, которая прекращается добавлением стоп-раствора.

Таким образом, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в аналогичной последовательности, чтобы избежать любого отклонения во времени реакции.

Планшет-ридеры измеряют вертикально.

Не касайтесь дна лунки.

Неспособность устранить должным образом соответствующие растворы на этапе(ах) аспирации или декантации может привести к снижению репликации и сомнительным результатам.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1 Расчет

Результаты выражаются в виде *единиц стандартного отклонения (СО)* (в то время как СО не является статистически определяемым стандартным отклонением!)

Для расчета СО необходимо определить:

- оптическую плотность (ОП) для расчета стандартного отклонения (СО) (СО является статистически определяемым стандартным отклонением) и

- среднюю ОП контролей (см. раздел 7, здоровые пациенты).

В процедуре 1 Вы должны измерить образцы 5 - 6 здоровых пациентов и использовать в качестве контролей.

Вы получаете $СО_{1\text{ контролей}}$, среднее $1_{\text{ контролей}}$

Теперь вычисляются *единицы стандартного отклонения* значений, полученных от пациентов, если Вы их измеряли в процедуре 1.

Абсорбция пациентов = ОП _{пациента}

$$СО = \frac{ОП_{\text{пациента}} - \text{среднее} 1_{\text{ контролей}}}{СО_{1\text{ контролей}}}$$

Эти результаты должны быть исправлены по причине вариаций между анализами.

Если Вы проводите измерение значений пациентов в другой процедуре (например, в процедуре 2), Вам нужно будет исправить "СО" коэффициентом вариации между анализами.

Сейчас в процедуре 2, Вам необходимо взять эти контроли и провести их измерение вместе с образцами пациентов.

Вы получаете СО 2 контролей, среднее 2 контролей, абсорбцию пациентов (ОП пациента).

Эти основные принципы необходимы для расчета *исправленных единиц стандартного отклонения (исправленного СО)*, чтобы интерпретировать значения абсорбции пациентов:

$$\text{Исправленное CO} = \frac{\text{среднее 1 контролей}}{\text{среднее 2 контролей}} \times \frac{\text{ОП пациента} - \text{среднее 2 контролей}}{\text{CO 2 контролей}}$$

Пример:**ПРОЦЕДУРА 1**

Контроли здоровых пациентов	ОП контроля
C1	0,45
C2	0,679
C3	0,521
Среднее 1 контролей 1-3	0,55
CO 1 контролей 1-3	0,1172

Интерпретация:

Пациента	ОП пациента	CO	Интерпретация:	
			Отрицательные результаты <2 отриц.	Положительные результаты ≥2 полож.
P1	0,765	1,834	<2 отриц.	
P2	0,875	2,7725		≥2 полож.
P3	0,489	-0,5204	<2 отриц.	
P4	1,543	8,4711		≥2 полож.

ПРОЦЕДУРА 2

Контроли здоровых пациентов	ОП контроля
C1	0,512
C2	0,732
C3	0,601
Среднее 2 контролей 1-3	0,615
CO 2 контролей 1-3	0,111

пациенты	ОП пациента	Исправленное CO	Интерпретация:	
			Отрицательные результаты <2 отриц.	Положительные результаты ≥2 полож.
P1	0,821	2,081		≥2 полож.
P2	1,314	7,063		≥2 полож.
P3	0,45	-1,667	<2 отриц.	
P4	1,893	12,913		≥2 полож.

10. РЕФЕРЕНТНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Отрицательные результаты: Значения "CO" или "исправленного CO" меньше чем 2,0 считаются отрицательными для значительного количества уровней ЦИК.

Положительные результаты: Значения "CO" или "исправленного CO" больше или равны 2,0 считаются положительными для значительного количества уровней ЦИК.

11. УПРАВЛЕНИЕ ОТХОДАМИ

Реагенты должны быть утилизированы в соответствии с местными правилами.

12. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

13. УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ**ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ОШИБОК / РЕКОММЕНДАЦИИ****Нет колориметрической реакции**

- Отсутствует реакция конъюгата после добавления
- Загрязнение конъюгатов и / или субстрата
- Ошибки при выполнении процедуры анализа (например, случайное распывание реагентов в неправильной последовательности или с неправильного флакона и т.д.)

Слишком низкая реакция (слишком низкие ОПи)

- Неправильный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Инкубационный период слишком короткий, инкубационная температура слишком низкая

Слишком высокая реакция (слишком высокие ОПи)

- Неправильный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Инкубационный период слишком долгий, инкубационная температура слишком высокая
- Недостаточное качество воды для промывочного буфера (низкая степень деионизации)
- Недостаточная промывка (конъюгаты не удалены должным образом)

Необъяснимые выбросы

- Загрязнение пипеток, наконечников или контейнеров
- Недостаточная промывка (конъюгаты должным образом не удалены)

Слишком высокое отклонение в процедуре

- Реагенты и / или стрипы предварительно не подогреваются до комнатной температуры перед использованием
- Промыватель планшет не промывается правильно (рекомендация: прочистить головку промывателя)

Слишком высокое отклонение между процедурами

- Условия инкубации не постоянны (время, температура, КВ%)
- Контроли и образцы не распределяются в одно время (с тем же интервалом) (проверить порядок раскапывания)
- Изменения ввиду человеческого фактора.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua