



ИФА-набор для количественного определения циркулирующего иммунного комплекса IgM в сыворотке или плазме

Каталог. № : EIA-3987
Количество тестов: 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 10-2007
Версия 4.0

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

Описание метода

Имуноферментный колориметрический метод для количественного определения концентрации IgM-CIC, в сыворотке и плазме.

Только для ин-витро диагностики.

Принцип

C3-закрепленный циркулирующий иммунный комплекс (ЦИК) сначала блокируется анти-C3-антителами иммобилизованными на микропланшете. Для количественного подсчета IgM-ЦИК, задействуются специфическое анти-IgM антитело с пероксидазой, а также H₂O₂-ТМБ в качестве субстрата. Количество образовавшегося продукта ферментной реакции, измеренного считыванием поглощения при 450 нм, пропорционально уровню твердофазных IgM-ЦИК.

Реагенты, материалы и инструменты

Реагенты, поставляемые в наборе
(достаточно для 96 определений)

- Инкубационный буфер** (100 мМ Боратный буфер, pH 7,4, Бычий сывороточный альбумин 10 г/л); 27 мл
- Конъюгат** (анти-IgM-пероксидазный конъюгат); 0,75 мл
- Конъюгатный буфер** (100 мМ Боратный буфер, pH 7,4, Бычий сывороточный альбумин 10 г/л); 25 мл
- Субстрат** (H₂O₂-ТМБ 0,25 г/л); 12 мл
- Стоп-раствор** (H₂SO₄ 0,15 M); 12 мл
- Микропланшет** Стрипы покрыты Анти-C3 (Fab')₂

Внимание:

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

Реагент, требующийся, но не поставляемый в наборе.

0,9% раствор NaCl

Материалы

- Стеклянные или пластиковые аналитические пробирки (около 5 мл)
- Вортекс
- Микропипетки, настраиваемые мультиканальные или повторяющие
- Инкубатор на 37°C

- Микропланшетный ридер, способный считывать поглощение при 450 нм

Подготовка реагентов

Разведение конъюгата

Для каждой серии из 16 лунок развести 100 мкл конъюгата (реагент 2) в 2 мл конъюгатного буфера (реагент 3). Хорошо перемешать, не допуская вспенивания. Реагенты стабильны в течение 3 часов при комнатной температуре.

Подготовка образца

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

Контроли

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 у группы здоровых доноров. Скрининг 50-80 людей достаточный для получения диапазона «нормальных значений». Вариации результатов разных постановок могут быть ликвидированы использованием при каждой постановке дублей 6 – 10 контрольных образцов.

Предостережения

- Сыворотка контрольных людей может храниться при - 20°C несколько месяцев.
- Образцы должны отмериваться маленькими аликвотами (50 мкл) и размораживаться только раз.
- Не использовать лиофилизированную сыворотку или каплю сыворотки в качестве контроля.
- Обращаться с контролем и с образцом одинаково.

Процедура

Растворение образца/контроля.

Пипетировать в тестовую пробирку:

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

Перемешать.

Процедура анализа

Так как все необходимо ставить в дублях, то каждое определение должно в себя включать две лунки под каждый образец, две лунки для контроля и две лунки для бланка.

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

Инкубировать при 37°C 30 минут.

Удалить содержимое из лунок.

Промыть 3 раза каждую лунку с:

Солевой раствор (0,9% NaCl)	300 мкл	300 мкл
-----------------------------	---------	---------

Позвольте оставшейся жидкости адсорбироваться на бумажном полотенце путем переворачивания плашки на нем (2 – 3 мин).

Распределить в каждую лунку:

Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------

Инкубировать при 37°C 30 минут.

Удалить содержимое из лунок.

Промыть 3 раза каждую лунку с:

Солевой раствор (0,9% NaCl)	300 мкл	300 мкл
-----------------------------	---------	---------

Позвольте оставшейся жидкости адсорбироваться на бумажном полотенце путем переворачивания плашки на нем (2 – 3 мин).

Распределить:

Субстрат ТМБ	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------

Инкубировать при комнатной температуре 15 минут.

Распределить:

Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------

Определить поглощение (E) считыванием при 450 нм с каждой тестируемой лунки (в течение 30 минут после добавления стоп-раствора) после выставления прибора на «ноль» с помощью бланка.

Интерпретация результатов

Подсчет

Результаты выражаются в единицах стандартного отклонения (*sd*), тогда как *sd* не является статистически определенным стандартным отклонением. Для расчета *sd* необходимо определить абсорбцию (ОП), чтоб измерить Стандартное отклонение (SD, статистически определенное стандартное отклонение) и среднюю ОП контролей (см. п. 5, здоровые пациенты).

На первом этапе необходимо измерить образцы 6-10 здоровых пациентов, которые вы используете в качестве контролей.

Вы получаете $SD1_{\text{контролей}}$ Среднее $1_{\text{контролей}}$

Теперь нужно рассчитать *единицы стандартного отклонения* значений, полученных от пациентов, если вы измерили их на этапе 1. Абсорбция пациентов = ОП_{пациента}

$$sd = \frac{\text{ОП}_{\text{пациента}} - \text{Среднее } 1_{\text{контролей}}}{SD1_{\text{контролей}}}$$

Эти результаты могут корректироваться из-за отличий между анализами.

Если вы измерите пациентов на следующем этапе (напр., этап 2), вы будете вынуждены откорректировать "*sd*" межпостановочным фактором вариации.

Вы получаете $SD2_{\text{контролей}}$, Среднее $2_{\text{контролей}}$, абсорбцию пациентов (ОП_{пациента})

Эта основа необходима для расчета откорректированных единиц стандартного отклонения (откорректированное *sd*), чтоб интерпретировать значения абсорбции пациентов:

$$\text{откоррект. } sd = \frac{\text{Среднее } 1_{\text{контролей}}}{\text{Среднее } 2_{\text{контролей}}} \times \frac{\text{ОП}_{\text{пациента}} - \text{Среднее } 2_{\text{контролей}}}{SD2_{\text{контролей}}}$$

Интерпретация

Отрицательный результат: значения "*sd*" или "откорректированных *sd*" менее 2,0 рассматриваются как отрицательные к ЦИК

Положительный результат: значения "*sd*" или "откорректированных *sd*" больше или равны 2,0 рассматриваются как положительные к ЦИК.

Примеры см. в оригинале инструкции на стр. 6

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Проводиться в соответствии с местным законодательством.

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