



Набор для количественного измерения панкреатической липазы (h-p-Lipase) в сыворотке человека

Кат. № : EIA-4459
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

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

Методика от 11-02-2008

Только для использования специалистами

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ и ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Липаза (триглицерол ацилгидролаза, ЕС 3.1.1.3) гидролизует преимущественно сложные эфиры глицерина длинноцепной жирной кислоты, фермент, который является специфическим к панкреазе. Активность сыворотки липазы имеет тенденцию к повышению через такое же самое время как повышение амилазы сыворотки при остром панкреатите. Исследования панкреатической липазы и амилазы в сыворотке привнесли новую область для лабораторного обнаружения и дифференциации панкреатических болезней. Однако текущие методики для обнаружения деятельности липазы, использующие турбидиметрические методы - относительно сложные.

Эти методы являются неспецифическими и имеют низкую чувствительность.

Этот набор предоставляет систему ИФА для специфического определения панкреатической липазы в сыворотке с высокой чувствительностью как средство контроля пациентов, страдающими панкреатическими болезнями.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Lipase ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), основанный на принципе "сэндвича". Лунки покрыты специфическими анти-h-p-lipase антителами. Образцы инкубируются в лунках с ферментным конъюгатом, который является другими анти-h-p-lipase антителами, химически соединенными с пероксидазой хрена. Несвязанный ферментный конъюгат смывается, и количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации h-p-lipase, присутствующей в образце, стандартах и контролях.

После добавления субстрата и хромогена, интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна концентрации h-p-lipase в образцах.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор DRG Lipase ELISA предназначен только для диагностического использования *in vitro*.
2. Компоненты этого набора предназначены для использования как единого целого. Компоненты разным партий не должны перемешиваться.
3. Предупреждение о потенциально биоопасном материале: основа Отрицательного и Положительного контролей - человеческая сыворотка. Сыворотка оказалась отрицательной к антителам поверхностного антигена гепатита В, ВИЧ и вируса гепатита С при анализе FDA подтвержденными реагентами. Поскольку никакой метод анализа не может обеспечить полную уверенность в том, что поверхностный антиген гепатита В, ВИЧ и вирус гепатита С или другие возбудители инфекций отсутствуют, эти реагенты должны использоваться с соблюдением 2 уровня биологической безопасности, как рекомендуется при обращении с любой потенциально инфекционной человеческой сывороткой или образцом крови.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8°C в холодильнике. Хранить микролунки герметично закрытыми в сухом мешочке с осушителями.
2. Невскрытые реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
3. Раствор А и раствор В должны быть бесцветными; если раствор становится синим, его необходимо заменить. Не подвергайте реагенты анализа воздействию сильного света во время хранения или использования.

УКАЗАНИЯ по БЕЗОПАСНОСТИ

1. Положительный контроль человеческого происхождения и оказался отрицательным к антителам поверхностного антигена гепатита В, ВИЧ и вируса гепатита С. Однако, в целях безопасности, с ним необходимо обращаться как с инфекционными материалами.
2. Не курит и не ест на территориях где используются образцы или реагенты наборов.
3. Не пипетировать ртом. Надевать полихлорвиниловые перчатки при обращении с реагентами или образцами, и после этого тщательно вымыть руки.
4. Инфекционные образцы и разливания, не содержащие кислоты, необходимо тщательно протирать 5 % раствором гипохлорида натрия.
5. Перед удалением все отходы должны быть должным образом дезинфицированы. И жидкие и твердые отходы могут быть обработаны в автоклаве по крайней мере в течении одного часа при 121.5°C. Твердые отходы можно также сжигать. Некислотные жидкие отходы перед аналогичной обработкой требуют нейтрализации и чтобы получить эффективную дезинфекцию должны оставаться нетронутыми в течении 30 минут.
6. Избегать контакта кожи и слизистых с соляной кислотой.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. **Микролуночные полоски** (96 лунок): Лунки. Покрытые антителами анти-h-p-lipase. 8x12 полосок.
2. **Разбавитель образца или нулевой стандарт** (11 мл): 1 бутылка.
3. **Ферментный конъюгат** (11 мл): антитело анти-h-p-lipase, конъюгированное с пероксидазой хрена.
4. **Набор референтных стандартов** (каждая пробирка по 0.75 мл). Концентрации - 10, 50, 100, 200 и 400 Е/л.
5. **Раствор А** (11 мл): Буферный раствор, содержащий перекись водорода.
6. **Раствор В** (11 мл): Раствор тетраметилбензидина.
7. **Концентрат промывочного буфера** (50 мл): Приготовьте рабочий промывочный буфер, добавив 50 мл концентрата промывочного буфера в 950 мл дистиллированной воды.
8. **Стоп раствор:** раствор 2 N HCl.
9. **Штатив для лунок:** Для закрепления отдельных лунок.

ТРЕБУЕМЫЕ, но НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Считывающее устройство для микролунок на 450 нм.
2. Дозатор с наконечниками на 25, 50 и 100 мкл.
3. Спринцовка на 1 л.

ЗАБОР и ОБРАЩЕНИЕ с ОБРАЗЦАМИ

Соберите кровь асептически венепункцией, дайте крови свернуться. Отцентрифугируйте её при комнатной температуре для получения сыворотки и храните в стерильных пробирках. Если нет возможности анализировать сыворотку немедленно, они могут храниться при 2-8°C в течении недели или в течении 6 месяце в замороженном состоянии – 20°C. Не рекомендуется повторное замораживание и размораживание. Не храните в саморазмораживающей морозилке. Не используйте гиперлипемические, гемолизированные, зараженные или обработанные теплом образцы, так как они могут привести к ошибочным результатам.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Перед началом анализа приведите все образцы и реагенты к комнатной температуре, и каждый осторожно перемешайте.
2. Перед началом анализа все реагенты и образцы должны быть готовыми к использованию. Как только начался анализ, для получения наиболее надежных и непротиворечивых результатов, он должен быть проведен без остановки.
3. Для каждого образца используйте новые сменные наконечники.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. закрепите желательное число покрытых лунок в штативе. Отметьте в информационном листе идентификацию образцов.
2. Распределите соответствующую лунку в двойном экземпляре 25 мкл стандартов, серологических образцов.
3. Распределите в каждую лунку 100 мкл ферментного конъюгата и перемешивайте в течении 5 секунд, инкубируйте при комнатной температуре в течении 30 минут.
4. Удалите смесь, и промойте лунки 5 раз буфером промывочного раствора (300 мкл/лунки/при каждой промывке). Убедитесь, что лунки тщательно промыты и полностью высушены. Недостаточная промывка может вызывать ошибочно положительные результаты.
5. Распределите в каждую лунку 100 мкл раствора А и 100 мкл раствора В. Перемешивайте в течении 5 секунд, инкубируйте в темноте в течении 15 минут.
6. Остановите реакцию путем добавления в каждую лунку 50 мкл стоп раствора и проведите считывание при 450 нм с помощью микролуночного считывающего устройства против контрольной лунки (только Раствор А и Раствор В).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать во время анализа контроли низкого, нормального и высокого уровня для отслеживания качества анализа. Контроли должны рассматриваться как неизвестные. Полученные результаты должны соответствовать установленным значениям Контроля. Контроль не должен содержать азида натрия. Каждая лаборатория должна иметь свои специфические условия проведения анализа. Значительное отклонение от полученных данных говорит о незаметных изменениях в экспериментальных условиях или разложении компонентов набора. Свежие реагенты используются для определения необходимости для вариаций.

Результаты

Для исследования концентрации Anti-H.Pylori в неизвестном образце строится кривая.

1. Запишите поглощение, полученное в результате анализа на считывателе.
2. Нанесите точки на миллиметровой бумаге на графике поглощения дубликата референс-сыворотки в сравнении с активностью Anti-H.Pylori для каждого стандарта и для исследуемого образца (не выводить среднее число дубликата референс-сыворотки перед нанесением данных).
3. Нарисуйте наиболее подходящую кривую по этим точкам.
4. Для определения уровня неизвестной активности Anti-H.Pylori изобразите среднее значение неизвестного поглощения дубликата на вертикальной оси граф; найдите точку пересечения на кривой и прочтите концентрацию (в мл) с горизонтальной оси граф (среднее число неизвестных дубликатов можно выводить по изображенному). В последующем примере среднее поглощение составляет 1,603 (количество пересечений в кривой) при концентрации Anti-H.Pylori 64,0 мл.

Пример 1. (Типичные результаты для IgG, M или A)

Идентиф-я образца	Лунка №	Поглощ. (A)	Средняя Поглощ. (B)	Кол-во
Cal A	A1	0.042		

	B1	0.046	0.044	0
Cal B	C1	0.424	0.406	10
	D1	0.388		
Cal C	E1	0.810	0.791	25
	F1	0.772		
Cal D	G1	1.351	1.312	50
	H1	1.273		
Cal E	A2	2.377	2.328	100
	B2	2.279		
Пациент	C2	0.163	0.172	5.2
	D2	0.182		
Пациент	A3	1.534	1.603	64.0
	B3	1.671		

Параметры Контроля Качества

Максимальное поглощение (100 Е/мл калибратор)=> 1.2

Ограничения процедуры

А. Подготовка Анализа

Очень важно чтобы время реакции в каждой лунке было одинаковым при выведении результатов. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут. При использовании больше чем 1 планшета рекомендуется вывести повторно кривую дозы.

Добавление субстратного раствора ведет к кинетической реакции, которая останавливается добавлением предотвращающего раствора. Поэтому, добавление субстрата и предотвращающего раствора должно осуществляться в одинаковой последовательности для предотвращения отклонений во время реакции.

Планшеточные считыватели проводят измерения вертикально. Не касайтесь дна лунок.

Неправильное извлечение раствора во время промывочных шагов аспирации или декантации может привести к плохому отображению результатов и их неадекватности.

Очень высокая концентрация Anti-H.Pylori в образцах пациента может незамедлительно загрязнить другие образцы. Плохие дубликаты являются результатом непосредственного загрязнения. При любой повторной проверке любого человеческого образца, происходит поглощению в 3,0 единицы.

Образцы, подверженные микробиологическому загрязнению не должны использоваться.

Б. Интерпретация Результатов

При использовании компьютера для интерпретации данных анализа, необходимо учитывать, что ожидаемые показатели калибратора являются ниже 10% определенной концентрации.

Наличие IgG и IgA антител к H.Pylori считается подтвержденным когда уровень сыворотки превышает 20 Е/мл.

Наличие IgM антител к H.Pylori считается подтвержденным когда уровень сыворотки превышает 40 Е/мл.

Клиническое определение результата должно осуществляться совместно с определением наличия желудочно-кишечной болезни. Однако, клинические выводы должны не только основываться на данном анализе, но как дополнение к клиническим обследованиям пациента или к другим анализам из области гистологии, уреазы, деятельности бактерий. Положительный результат не указывает на наличие желудочно-кишечной болезни и не дифференцирует между колонизацией и инфекцией H.Pylori. Соответственно, отрицательный результат не демонстрирует отсутствие инфекции H.Pylori, скорее всего очень низкую плотность антитела, что можно отнести к ранним стадиям колонизации.

Характеристики проведения анализа

А. Точность Anti-H. Pylori - IgG

Точность анализа и ряда анализов Anti-H. Pylori - IgG Микропланшеточной EIA Системы Анализа определена с

помощью двух разноуровневых контрольных сывороток. Количество, среднее число, стандартное отклонение (σ) и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток отображено в Табл. 2 и 3.

Табл. 2

Точность Внутреннего Анализа (измер. в мл)

Образец	N	X	σ	KB
Отрицательный	20	5,5	0,31	5,6%
Положительный	20	43,2	1,85	4,3%

Табл. 3*

Точность Межтестового Анализа (измер. в мл)

Образец	N	X	σ	KB
Отрицательный	10	5,8	0,40	6,9%
Положительный	10	42,1	2,10	5,0%

* Определено 10 экспериментами при дубликации.

В. Точность Anti-H. Pylori – IgM

Точность анализа и ряда анализов *Anti-H. Pylori - IgM* Микропланшеточной EIA Системы Анализа определена с помощью двух разноуровневых контрольных сывороток. Количество, среднее число, стандартное отклонение (σ) и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток отображено в Табл. 2 и 3.

Табл. 4

Точность Внутреннего Анализа (измер. в мл)

Образец	К-во	X	σ	KB
Отрицательный	20	3,1	0,23	7,4%
Положительный	20	39,8	1,65	4,1%

Табл. 5*

Точность Межтестового Анализа (измер. в мл)

Образец	К-во	X	σ	KB
Отрицательный	10	3,8	0,34	8,9%
Положительный	10	37,1	2,80	7,5%

* Определено 10 экспериментами при дубликации.

С. Точность Anti-H. Pylori – IgA

Точность анализа и ряда анализов *Anti-H. Pylori - IgA* Микропланшеточной EIA Системы Анализа определена с помощью двух разноуровневых контрольных сывороток. Количество, среднее число, стандартное отклонение (σ) и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток отображено в Табл. 2 и 3.

Табл. 6

Точность Внутреннего Анализа (измер. в мл)

Образец	К-во	X	σ	KB
Отрицательный	20	2,8	0,22	8,5%
Положительный	20	25,5	1,35	5,3%

Табл. 7*

Точность Межтестового Анализа (измер. в мл)

Образец	К-во	X	σ	KB
Отрицательный	10	2,5	0,20	8,0%
Положительный	10	25,1	1,90	7,6%

* Определено 10 экспериментами при дубликации.

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.com