

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИГОКСИНА

1669-15, Digoxin

Каталог. № : 1669-15
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 04-08-2008



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

Предназначение: Количественное определение концентраций Дигоксина в сыворотке или плазме человека путем микропланшетного иммуноферментного анализа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Клиническая полезность измерения дигоксина в сыворотке является следствием его низкого терапевтического показателя; между терапевтическими и токсическими уровнями в тканях очень небольшая разница. Кроме того, люди могут отличаться своей реакцией к дигоксину с очевидным увеличением восприимчивости к токсичности с возрастом.

Действие дигоксина направлено на увеличение силы и скорости сокращения миокарда. Это необходимо при лечении застойной сердечной недостаточности и аритмии типа предсердной фибрилляции и трепетания предсердий.

Концентрации дигоксина в миокарде на уровнях сыворотки остаются относительно стабильными в процессе нормального функционирования почек. Этот коэффициент распределения дигоксина между сердцем и сывороткой составляет приблизительно от 29 до 1. Таким образом, мониторинг терапии дигоксина измерением уровней сыворотки возможен с фармакологической точки зрения, при условии последующего уравнивания пост-абсорбции уровней сыворотки, связанных с уровнями тканей. Практический и чувствительный метод количественного определения дигоксина в сыворотке – иммуноферментный анализ.

Эта методика микролуночного иммуноферментного анализа обеспечивает пользователя оптимальной чувствительностью при выполнении нескольких технических манипуляций. В этом методе сначала добавляется в лунку микропланшета контрольная сыворотка или контроль и образец пациента. Добавляется конъюгат фермент-дигоксина, затем реагенты перемешиваются. В среде ограниченного количества сочетаемых областей антител, зафиксированных на лунках, происходит конкурентная реакция между ферментным конъюгатом и нативным дигоксином.

После завершения заданного инкубационного периода, связанный антителами конъюгат фермент-дигоксина отделяется от несвязанного конъюгата фермент-дигоксина путем аспирации или декантации. Действие фермента, существующего на поверхности лунки количественно определяется через реакцию с соответствующим субстратом, развивающим цвет.

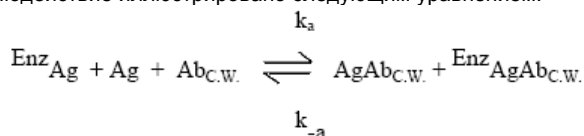
Использование нескольких референтных сывороток с известной концентрацией дигоксина позволяет построить график активности и концентрации. Исходя из сравнения с кривой ответной дозы, активность неизвестного образца может быть соотнесена с концентрацией дигоксина.

ПРИНЦИП

Иммуноферментометрический анализ:

Необходимые реагенты, требуемые для иммуноферментометрического анализа, включают иммобилизованное антитело, конъюгат фермент-антигена и нативный антиген.

При смешивании иммобилизованного антитела, конъюгата фермент-антигена и нативного антигена, происходит реакция между нативным антигеном и конъюгатом фермент-антитела в ограниченном количестве нерастворимых связывающих областей. Взаимодействие иллюстрировано следующим уравнением:



$\text{Ab}_{\text{c.w.}}$ = моноспецифическое иммобилизованное антитело (постоянное количество)

Ag = нативный антиген (непостоянное количество)

EnzAg = конъюгат фермент-антигена (постоянное количество)

$\text{AgAb}_{\text{c.w.}}$ = комплекс антиген-антитела

$\text{EnzAgAb}_{\text{c.w.}}$ = комплекс антител конъюгата фермент-антигена

k_a = коэффициент константы ассоциации

k_{-a} = коэффициент константы диссоциации

$K = k_a / k_{-a}$ = равновесная константа

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанных антител отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Ферментная активность во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. Используя несколько различных референтных сывороток известных концентраций антигена, дает возможность вывести кривую ответной дозы, из которой может быть установлена концентрация антигенов неизвестного образца.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

A. Референтные человеческие сыворотки – 1 мл/фл.

Шесть (6) флаконов референтных сывороток для дигоксина при концентрациях 0 (A), 0,25 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 2,0 (E), и 4,0 (F) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Добавлен консервант.

B. Конъюгат фермент-антигена

Один (1) флакон конъюгата дигоксин-щелочной фосфатазы в буфере с красителем. Хранить при 2-8°C. Добавлен консервант.

C. Микропланшет, покрытый анти-дигоксином – 96 лунок

Один 96-луночный микропланшет, покрытый кроличьим анти-дигоксиновой сывороткой и упакованный в пакет из фольги с осушителем. Хранить при 2-30°C.

D. Концентрат промывочного раствора – 20 мл

Один (1) флакон, содержащий поверхностно-активное вещество в буферизированном солевом растворе. Добавлен консервант. Хранить при 2-30°C.

E. Субстрат p-NPP - 10.0 мл/фл.

Одна (1) бутылка, содержащая p-нитрофенил фосфат p-NPP. Хранить при 2-8°C.

F. Стоп реагент - 6.0 мл/фл.

Одна (1) бутылка, содержащая сильную кислоту (1N NaOH). Хранить при 2-30°C.

G. Инструкция пользователя

Замечание 1: Не используйте реагенты по истечении срока годности набора.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны в течении шестидесяти (60) дней если хранить при 2-8°C.

Замечание 3: Вышеуказанные реагенты предназначены для одного микропланшета на 96 лунок.

Требуемые, но не поставляемые:

1. Микропипетка(и) для точного дозирования 25 мкл с точностью более чем 1,5%.
2. Многоканальный дозатор(ы) для повторных дозирования объемом 0,100 и 0,300 мл с точностью более чем 1,5% (выборочно).
3. Микропланшетный промыватель или гибкая бутылка (выборочно).
4. Микропланшетный считыватель со считыванием длины волны на 405 и 620 нм;
5. Пробирка(и) для смешивания реагентов.
6. Промокательная бумага для промокания лунок микропланшета.
7. Полиэтиленовая пленка или накрыватель микропланшета для этапов инкубации.
8. Вакуумный аспиратор (выборочно) для этапов промывки.
9. Таймер.
10. Материалы контроля качества.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для диагностического использования in vitro

Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных

Все продукты, которые содержат человеческую сыворотку, оказались не реагирующими к поверхностному антигена гепатита В, ВИЧ 1&2 и антителам вируса гепатита С при использовании FDA утвержденных реагентов. Так как никакой известное испытание не может предоставить полной уверенности в отсутствии возбудителей инфекции, все человеческие серологические продукты должны быть обработаны как потенциально опасные и способные к передаче болезни. Соответствующие лабораторные процедуры по обработке продуктов крови предоставляются в Центре контроля болезней при Национальном институте здоровья, «Биологическая опасность в микробиологических и биомедицинских Лабораториях», 2-ое

издание, 1988, Министерство здравоохранения и социальных служб США.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Соберите образец(ы) венепункцией в 10 мл силиконовую вакуумную пробирку(и) или вакуумную пробирку(и) с ЭДТА или гепарином. Следует соблюдать обычные предосторожности при заборе образцов путем венепункции. Отделите эритроциты путем центрифугирования. В течении всей процедуры анализа дигоксина используйте сыворотку или плазму.

Храните образец при 2-8°C не более чем 48 часов. Если ожидается задержка в анализе, храните сыворотки для анализа при -20°C в течении 30 дней. При анализе в двойном экземпляре требуется 0.05 мл образца.

Перекрестная реактивность антитела дигоксина к отобраным веществам была оценена путем добавления в сыворотку различных концентраций интерферирующего вещества. Перекрестная реактивность была вычислена из соотношения между дозой интерферирующей материи и дозой дигоксина, необходимого для замещения то же самое количество индикатора.

Вещество	Перекрестная реактивность
Дигоксин	1.000
Дигитоксин	0.019
Дигиторсигенин	0.017
Ланатозид А	0.016
Уабаин	0.001
Спирнолактон	0.001
Преднизон	0.001
Прегненолон	0.001
Дигитоксоза	0.001

Ди-ацетилдигоксин, β-метилдигоксин, α-ацетелдигоксин – полностью перекрестно взаимодействуют в анализе.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ:

1. Промывочный буфер

Разбавить содержимое промывочного концентрата до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в соответствующей таре для хранения. Хранить при комнатной температуре 20-27°C до 60 дней.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа привести все реагенты, референтные сыворотки и контроли к комнатной температуре (20-27°C).

- Поместить нужное количество лунок в рамку для каждой референтной сыворотки, контроля и образца пациента для анализа в двойном экземпляре. **Поместить неиспользуемые полоски микролунок назад в пакет из фольги. Запечатать и хранить при 2-8°C.**
- Раскапать 0,025 мл (25 мкл) соответствующей референтной сыворотки, контроля и образца в соответствующие лунки.
- Добавить во все лунки по 0,100 мл (100 мкл) раствора конъюгата дигоксин-фермента.
- Осторожно вихрируйте микропланшет в течении 20-30, чтобы перемешать его содержимое. Накройте полиэтиленовой пленкой.
- Инкубировать при комнатной температуре 30 минут.
- Удалить содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. При декантации постучать по планшету и промокнуть его промокательной бумагой.
- Добавить 300 мкл промывочного буфера (см. Раздел Подготовка Реагентов), декантировать (постучать и промокнуть) или аспирировать. Повторить еще два (2) раза - в общем количестве провести три (3) промывки. **Возможно использование автоматического или ручного промывателя планшета. Необходимо следовать указаниям производителя по правильному использованию. Если используется гибкая бутылка, заполнить каждую лунку до края, сжимая емкость. Избегать воздушных пузырьков. Декантировать раствор и повторить промывку еще два (2).**
- Добавить 0,100 мл (100 мкл) субстрата p-NNP во все лунки. **Всегда добавлять реагенты в одном порядке, чтобы минимизировать разницы времени реакции между лунками.**
- Инкубировать при комнатной температуре 30 минут.
- Добавить 0.050 мл (50 мкл) стоп реагента в каждую лунку и осторожно помешать в течении 15-20 секунд. **Всегда добавлять реагенты в одном порядке, чтобы минимизировать разницы времени реакции между лунками.**

- Считать абсорбцию в каждой лунке при 405 нм (используя референтную длину волны 620-630 нм, чтобы минимизировать недостатки считывания лунки) на микропланшетном считывателе. **Результаты необходимо считать в пределах тридцати (30) минут после добавления стоп раствора.**

ПРИМЕЧАНИЕ: Для повторного анализа образцов с концентрациями более чем 4 нг/мл внесите в лунку образца 12.5 мкл образца и 12.5 мкл 0 референтной сыворотки. Умножьте значение считывания на 2, чтобы получить концентрацию дигоксина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика чувствительности дозы используется, чтобы установить концентрацию фолликул стимулирующего гормона в неизвестных образцах.

- Зафиксируйте меру поглощения света, полученную из распечатки планшетного считывателя, как указано в Примере 1.
- Постройте график меры поглощения света для каждой двойной референтной сыворотки против соответствующей концентрации дигоксина в нг/мл на линейной миллиметровой бумаге (не выводите в среднем дубликаты референтных сывороток перед построением).
- Выведите наилучше подобранную кривую сквозь составленные точки.
- Для определения концентрации дигоксина неизвестного образца, расположите среднюю меру поглощения света дубликатов для каждого неизвестного образца на вертикальной оси графика, найдите точку пересечения на кривой и считайте концентрацию (в нг/мл) с горизонтальной оси графика (дубликаты неизвестного образца могут быть усреднены как указано). В следующем примере средняя мера поглощения света составляет 1.262 (пересекает калибровочную кривую на (0.93 нг/мл) концентрации дигоксина (См. Рисунок 1).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

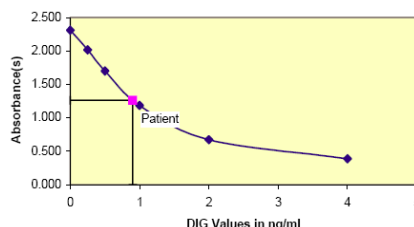
Каждая лаборатория должна анализировать контроли на уровне гипотиреоидного, эутиреоидного и гипертиреоидного диапазона для контроля эффективности анализа. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные величины и значения должны определяться в каждой проводимой процедуре анализа.

Необходимо вести таблицы контроля качества, чтобы следить за эффективностью поставляемых материалов. Подходящие статистические методы должны использоваться, чтобы установить тенденции. Значительная девиация от установленной эффективности может указывать на незамеченное изменение в экспериментальных условиях или ухудшение реагентов набора. Необходимо использовать новые реагенты, чтобы определить причину этих отклонений.

ПРИМЕР 1

Образец	Номер лунки	Abs (A)	Среднее Abs (B)	Значение (нг/мл)
Cal A	A1	2.306	2.311	0
	B1	2.316		
Cal B	C1	2.012	2.018	0.25
	D1	2.024		
Cal C	E1	1.717	1.701	0.5
	F1	1.685		
Cal D	G1	1.144	1.184	1
	H1	1.224		
Cal E	A2	0.662	0.672	2
	B2	0.683		
Cal F	C2	0.379	0.387	4
	D2	0.396		
Пациент	E2	1.240	1.262	0.9
	F2	1.284		

Рисунок 1



*Данные, представленные в Примере 1 - только для иллюстрации и не должны использоваться вместо характеристики чувствительности дозы, подготовленной с каждым анализом.

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Чтобы результаты анализа считались действительными, должны быть выполнены следующие критерии:

1. Абсорбция (ОП) 0 калибратора в нг/дл должна быть ≥ 1.3 .
2. Четыре из шести объединений контролей качества должны быть в пределах установленных диапазонов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

А. Эффективность анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции в каждой лунке было одинаковым. Во избежание сбоя анализа раскапывание образцов не должно превышать десяти (10) минут. Если используется больше чем один (1) планшет, рекомендуется повторить характеристику чувствительности дозы.
2. Добавление раствора субстрата вызывает кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому, добавление субстрата и стоп раствора должно проводиться в той же самой последовательности, чтобы избежать любое отклонение времени в течение реакции.
3. В анализе не должны использоваться образцы, которые заражены микробиологическим путем. Высоко липемический или гемолизированный образец(цы) не должен использоваться.
4. Считыватели планшета измеряют вертикально. Не касайтесь дна лунок.
5. Недостаточное удаление раствора на этапе(ах) аспирации или декантации может привести к недостаточной репликации и ложным результатам.

В. Интерпретация

1. Некоторые состояния болезни, как известно, увеличивают восприимчивость пациента к токсичности дигоксина. Следующие примеры есть такими состояниями болезни:
 - a. Гипокалемия
 - b. Гипотиреоз
 - c. Отказ почек
 - d. Общий порок сердца
2. Ряд исследователей зафиксировали относительно высокие уровни дигоксина сыворотки младенцев. Однако, обследуемые на дигоксин дети старше 2 лет демонстрируют уровни дигоксина в сыворотке более похожие на уровни взрослых.
3. Пациенты, проходящие одновременно терапию хинидина и дигоксина, должны тщательно проверяться. Уровни дигоксина сыворотки могут повышаться более чем в два раза от стабилизирующего уровня в пределах 24 часов после начала терапии хинидином и могут оставаться повышенными несколько дней.
4. Пациенты, получающие диуретический фуросемид могут не отображать значения дигоксина, соответствующие клинической картине. При одновременных приготовлениях фуросемида и дигиталиса, желатильно проводить контроль пациентов.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Обычный терапевтический диапазон дигоксина в совершеннолетних - 0.5-2.0 нг/мл. Однако, есть перекрытие концентраций дигоксина сыворотки в группах пациентов с и без клинической токсичности. Значительное число нетоксичных пациентов имеет концентрации сыворотки более чем 2.0 нг/мл и, соответственно, значительное число токсических пациенты имеют серологические значения в диапазоне 1.4-2.0 нг/мл. Также, для пациентов с наджелудочковой аритмией могут потребоваться более высокие дозы, чтобы контролировать их кардиальный коэффициент: концентрации дигоксина в этих пациентов в пределах от 2.0-4.0 нг/мл без клинической токсичности. По этим причинам, врач должен ставить определенный клинический диагноз после оценки всех клинических и лабораторных результатов.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Точность

Точность системы микропланшетного ИФА дигоксина в пределах и между анализами была определена в анализах трех различных уровней объединенных контрольных сывороток. Количество, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток представлены в Таблице 2 и Таблице 3.

ТАБЛИЦА 2

Точность в пределах анализа (значения в нг/мл)

ОБРАЗЕЦ	К-во	X	σ	К.В. (%)
Низкий	12	0,66	0,05	7,6
В норме	12	1,91	0,10	5,2
Высокий	12	3,20	0,17	5,3

ТАБЛИЦА 3

Точность между анализами* (значения в нг/мл)

ОБРАЗЕЦ	К-во	X	σ	К.В. (%)
Низкий	10	0,68	0,06	9,1
В норме	10	1,83	0,12	6,6
Высокий	10	3,15	0,20	6,5

*Согласно измерения в 10 экспериментах в двойном экземпляре.

В. Чувствительность

Процедура для определения Дигоксина имеет чувствительность 2,5 пг. Это эквивалентно образцу с концентрацией 0,04 нг/мл.



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