

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ (CIC C3d)

EIA-3170, CIC C3d ELISA

Каталог. № : EIA-3170
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 07-2011
Версия 7.0



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

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Назначение использования

Набор DRG CIC C3d ИФА разработан для количественного определения CIC C3d в сыворотке и плазме человека. Набор предназначен только для лабораторного использования.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Циркулирующие иммунные комплексы, C3d-фиксированные, сначала блокируются анти-C3d, которые иммобилизованы на микропланшете. Во время этой фазы иммунный комплекс соединяется с анти-C3d, нанесенными на микропластину. Микропланшет промывается для удаления несвязанных сывороточных белков.

Во второй фазе добавляется конъюгат античеловеческий IgG-пероксидаза, который позже связывается с иммунным комплексом на планшете. Промывкой удаляется несвязанный конъюгат. В третьей фазе добавляется субстрат ТМВ, который реагирует с конъюгатом на пластине.

Количество комплекса CIC IgG пропорционально интенсивности цвета, считанного при 450 нм.

Концентрация иммунного комплекса в образце рассчитывается на основе серий стандартов. Результаты измеряются в мкг/мл.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

3.1 Поставляемые реагенты

1. **Стандарты** CIC C3d STD0-STD2 (3 пробирки, 1.5 мл каждая)
2. **Отрицательный контроль** (1 пробирка = 1.5 мл)
Положительный контроль (1 пробирка = 1.5 мл)
3. **Инкубационный буфер** (1 бутылка) 50 мл
Фосфатный буфер 74 мМ рН 7.4; BSA 1 г/л
4. **Конъюгат** (1 бутылка) минимум 0.5 мл
Анти-человеческий конъюгат IgG-HRP
5. **Конъюгатный буфер** (1 бутылка) 20 мл
Фосфатный буфер 74 мМ рН 7.4; BSA 1 г/л
6. **Микропланшет**, покрытый CIC C3d (1)
7. **Концентрат промывочного буфера** 10 X, 2x (1 бутылочка = 50 мл). NaCl 16 г/л; tween 20 1 г/л, 20 мМ Фосфатного буфера, рН 7.4
8. **ТМВ субстрат** (1 бутылка) 15 мл
H₂O₂ ТМВ 0.25 г/л (избегать контакта с кожей)
9. **Стоп Раствор** (1 флакон) 15 мл
Серная кислота 0.15 моль/л (избегать контакта с кожей)

3.2 Необходимые материалы, не поставляемые с набором

– Дистиллированная вода.

3.3 Вспомогательные материалы и инструментарий

- Автоматический дозатор
- Считывающее устройство (450 нм)

Примечание: Все реагенты и микропланшет хранить при 2-8 °С в темном месте. Использовать до окончания срока годности. Оставить микропланшет при комнатной температуре на несколько минут перед отделением необходимого количества лунок. Поместить неиспользуемые лунки в упаковку и запечатать.

4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике. Только для профессионального использования.
- При работе с образцами и реагентами использовать защитную одежду.
- Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы утвержденными методами

и дали отрицательные результаты с ВИЧ 1/2, HBsAg и HCV. Со всеми реагентами обращаться как с потенциально опасными.

- Некоторые реагенты содержат Proclin 300 в качестве консерванта. В случае контакта с глазами или кожей, немедленно промыть водой.
- ТМВ раствор вреден. Вызывает раздражение кожи и слизистой. В случае возможного контакта промыть глаза с достаточным количеством воды и вымыть руки с мылом и водой. Вымыть загрязненные предметы перед их повторным использованием. Вывести человека на свежий воздух при вдыхании.
- Избегать контакта со стоп-раствором, содержащим H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
- Не подвергать реагент ТМВ/H₂O₂ прямым солнечным лучам, контакту с металлами или окислителями.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Пипетирование образцов и реагентов должно проводиться как можно быстрее и с одинаковыми промежутками для каждого шага.
- Хранить все реагенты при 2-8 °С в оригинальной упаковке. Любые исключения четко указаны.
- Привести реагенты к комнатной температуре (22-28 °С) перед тестированием и тщательно перемешать.
- Не смешивать компоненты из разных наборов и партий. Не использовать компоненты набора после окончания срока годности.
- Если Вы используете автоматизированное оборудование, Вы несете ответственность за его тестирование.
- Неполное или неаккуратное удаление жидкости из лунки может повлиять на точность результатов и/или увеличить значения.
- Для воспроизводимых результатов важно соблюдать постоянное время реакции каждой лунки. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут во избежание смещения анализа. если необходимо более 10 минут, придерживать такого же порядка внесения образцов. Если используется больше одного планшета. Рекомендуется повторить кривую для каждого планшета.
- Добавление Субстрата ТМВ инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому, стоп раствор и субстрат ТМВ добавлять с одинаковыми промежутками времени во избежание отклонения от установленной процедуры.
- Придерживаться инструкций по проведению контроля качества, анализируя контроли и/или парную сыворотку.
- Требуется максимальная точность для восстановления и распределения реагентов.
- Не использовать загрязненные образцы. Высоко липемические и гемолизированные образцы также не использовать.
- Снимать показания в вертикальном положении. Не касаться дна лунок.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Подготовка конъюгата

Разбавить концентрат конъюгата (реагент 4) **1:100** с буфером конъюгата (реагент 5). Количество разбавленного конъюгата пропорционально количеству тестов. Тщательно перемешать, избегать пенообразования. Стабилен 3 часа при 22-28 °С.

6.2 Подготовка Промывочного раствора

Разбавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора с дистиллированной водой до 500 мл перед использованием.

Для меньших объемов разводить 1:10. Разведенный раствор стабилен 30 дней при 2-8 °С. В растворе может наблюдаться наличие кристаллов, перемешать до полного растворения.

6.3 Подготовка образца

Данный анализ может проводиться как с сывороткой так и с плазмой. Образцы, не использованные в течение 24 часов, хранить при -20 °С. не оттаивать образцы больше одного раза.

Пипетировать в тестовую пробирку:

Сыворотка/плазма	10 мкл
Инкубационный буфер	500 мкл

Аккуратно перемешать. Избегать использования мешалки.

6.4 Процедура анализа

Так как анализ необходимо проводить в дублях, каждое определение должно включать 2 лунки для каждого Образца, две лунки для каждой точки стандартной кривой (S0-S2) и две для каждого контроля и одна для Бланка. Распределить:

Реагенты	Стандарт	Контрольные образцы	Бланк
Стандарт S ₀ -S ₂	100 мкл		
Контроли		100 мкл	
Разбавленный образец		100 мкл	
Инкубировать 30 минут при 37 °С. Удалить содержимое из всех лунок, промыть лунки 3 раза с 300 мкл разбавленного промывочного раствора.			
Разбавленный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубировать 30 минут при 37 °С. Удалить содержимое из всех лунок, промыть лунки 3 раза с 300 мкл разбавленного промывочного раствора.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать 15 минут в темноте при 22-28 °С.			
Стоп раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Слегка потрясти микропланшет. Считать Поглощение (Е) при 450 нм против Бланка в течение 15 минут после добавления стоп раствора.			

7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна провести анализ контролей при нормальном, высоком и низком уровнях СИС С3d для мониторинга работы теста. Обращаться с этими контролями как с неизвестными. Составить схемы контроля качества для отслеживания работы поставляемых реагентов. Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон допустимых значений. Использовать свежие образцы для определения причины вариации.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

8.1 Интерпретация результатов

При использовании программного обеспечения для подсчета результатов, предполагаемые значения калибраторов должны находиться в пределах 10 % установленных концентраций.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1 Среднее значение поглотительной способности

Подсчитать среднее значение поглотительной способности (Em) для каждой точки калибровочной кривой и для каждого образца.

9.2 Стандартная кривая

Стандарт имеет следующие концентрации:

S₀ 0 мкг Еq/мл

S₁ 16 мкг Еq/мл

S₂ 64 мкг Еq/мл

Отложить значения поглотительной способности стандартов против концентраций. Нарисовать кривую через отмеченные точки.

9.3 Подсчет результатов

Интерполировать значения образцов на стандартную кривую для получения соответствующих значений концентраций, выраженных в мкг Еq/мл.

10. КОНТРОЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

	мкг Еq/мл скоплений IgG
Отрицательный образец	< 16
Неопределенный образец	Между 16-18
Положительный образец	> 18

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

11.1 Точность

11.1.1 Внутрисерийная вариация

Внутрисерийная вариация была определена анализированием двух разных контрольных сывороток в дублях (x 16) в одном анализе. И составила 6.1 %.

11.1.2 Межсерийная вариация

Межсерийная вариация была определена анализированием трех разных контрольных сывороток из двух разных партий. И составила 13.9 %.

11.2 Достоверность

Восстановление образцов, "свободных от сыворотки", с добавлением 12.5-25-50 мкг Еq/мл СИС С3d дало среднее значение (\pm SD) 99.84 % \pm 5.07 % по отношению к оригинальным концентрациям.

11.3 Чувствительность

Наименьшая обнаруживаемая концентрация СИС С3d, которая может быть получена из нулевого стандарта, составила 0.60 мкг Еq/мл при доверительной границе 95 %.

12. УПРАВЛЕНИЕ ОТХОДАМИ

Реагенты должны быть уничтожены в соответствии с местными требованиями.

13. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

14. ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РАЗРЕШЕНИЕ

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ/ИХ РАЗРЕШЕНИЕ

Отсутствует колориметрическая реакция

- Нет реакции после добавления конъюгата
- Загрязнение конъюгатов и/или субстрата
- Ошибки при проведении процедуры (например, случайное пипетирование реагентов в ошибочных количествах или из ошибочных пробирок, и т.п.)

Слишком низкая реакция (слишком низкие ОП)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинальной упаковки)
- Слишком короткое время инкубации, инкубационная температура слишком низкая

Слишком высокая реакция (слишком высокие ОП)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинальной упаковки)
- Слишком долгое время инкубации, инкубационная температура слишком высокая
- Низкое качество воды
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Необъяснимые аномальные значения

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

Слишком высокое значение внутрисерийной вариации (CV %)

- Реагенты и/или лунки не приведены к комнатной температуре перед использованием
- Промывочное устройство не промывает как следует (совет: промыть головку устройства)

Слишком высокое значение межсерийной вариации (CV %)

- Непостоянство условий инкубации (температура, время)
- Контроли и образцы не вносились в одно и тоже время (с одинаковыми интервалами) (проверить порядок пипетирования)
- Вариации, связанные с человеческим фактором



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