



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЭЛСТАЗЫ МЕТОДОМ ИФА

Иммуно-ферментный анализ для количественного определения панкреатической эластазы человека в образцах кала как помощь в диагностике поджелудочной экзокринной функции

Кат.№ BS-86-01
Производитель: Bioserv Diagnostics, (Германия)

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

Методика от 21-09-2012

Только для использования в in-Vitro диагностике

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ИФА Панкреатической Эластазы от Bioserv Diagnostics – иммуноферментный анализ для количественного определения панкреатической эластазы в образцах человеческих фекалий для диагностики экзокринной функции поджелудочной железы.

ПРИНЦИП МЕТОДА

ИФА Панкреатической Эластазы от Bioserv Diagnostics является твердофазным иммуноферментным анализом, основанным на двойной сэндвич-технологии, в котором используются поликлональные антитела, распознающие различные эпитопы эластазы. Планшет покрыт поликлональными антителами к панкреатической эластазе человека (Э). Э, содержащаяся в образцах и стандартах, связывается с антителами во время инкубации с иммобилизацией на планшете. После промывки и удаления несвязавшихся компонентов добавляются вторые биотинилированные антитела, которые будут связываться с уже иммобилизованной Э. После 2-й инкубации и последующей промывки для визуализации добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, и после 3-й инкубации и промывки добавляется субстратный раствор ТМБ, образующий в ферментной реакции продукт, окрашенный в голубой цвет. Ферментная реакция останавливается через определенное время добавлением 0,25 моль/л раствора серной кислоты. Концентрация окисленного ТМБ, измеряется фотометрически при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ (на 96 определений)

- | | |
|--|-----------|
| 1. Набор контрольных стандартов (готовы к использованию) - в одном флаконе | 0.7 мл |
| - стандарт 1 (50 мкг эластазы/г - бесцветная крышка) | |
| - стандарт 2 (100 мкг эластазы/г - белая крышка) | |
| - стандарт 3 (200 мкг эластазы/г - желтая крышка) | |
| - стандарт 4 (500 мкг эластазы/г - голубая крышка) | |
| 2. Контроль 1 (эквивалент 90 мкг эластазы/г ± 20% - коричневая крышка), содержит 0.2% азида натрия | 0.7 мл |
| 3. Контроль 2 (эквивалент 200 мкг эластазы/г ± 20% - зеленая крышка), содержит 0.2% азида натрия | 0.7 мл |
| 4. Промывочный раствор (10 x концентрация) | 2 x 50 мл |
| 5. Экстракционный буфер (10 x концентрация) | 50 мл |
| 6. Биотинилированное антитело эластазы (второе антитело – красная крышка) | 0.12 мл |
| 7. Конъюгат стрептавидин-пероксидаза (готов к использованию) | 8 мл |
| 8. Раствор субстрата (раствор ТМБ, готовый к использованию) | 13 мл |
| 9. Стоп-раствор (0.25 моль/л H ₂ SO ₄ , готов к использованию) | 13 мл |
| 10. Микротитрованные полоски, покрытые поликлональными антителами анти-эластазы | 96 лунок |
| 11. Держатель для одиночных полосок | 1 x |

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм, опционально с фильтром ≥550 нм.
2. Дозаторы с наконечниками (5, 50, 100 и 1000 мкл).
3. Пробирки для разбавления образцов.
4. Дистиллированная или деионизированная вода.
5. Фильтровальная бумага.
6. Весы для взвешивания образцов фекалий.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор предназначен только для диагностики *in-vitro*.
2. Избегайте контакта стоп-реагента с кожей: этот реагент является раздражающим и обжигающим кожу веществом.
3. Не пипетируйте реагенты ртом.
4. Используйте только откалиброванные пипетки.
5. Пожалуйста, обращайтесь с образцами с предосторожностями как с потенциально инфекционным материалом.
6. Утилизируйте отходы в соответствии с национальными руководствами по биологической безопасности.

ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

1. Компоненты набора разработаны для использования как единое целое. Не используйте компоненты из других наборов.
2. Все реагенты и образцы должны достигнуть комнатной температуры (18-25°C) перед использованием.
3. Все реагенты необходимо перемешивать, не допуская образования пены.
4. Не прерывайте последовательность операций при выполнении начатого анализа, работайте без задержек.
5. Вносите реагенты и образцы на дно ячеек. Встряхивания ячеек после внесения реагентов не требуется.
6. Используйте новый одноразовый наконечник для каждого образца.
7. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки с флаконов, поместить стрипы в держатель, что обеспечит примерно одинаковые промежутки времени между каждым пипетированием без задержки.
8. Для оптимальных результатов тщательная промывка принципиальна: удаляйте остатки жидкости после промывки, опрокидывая планшет на фильтровальную бумагу.
9. Так как кинетика используемой ферментной реакции зависит от окружающей температуры, экстинкция коррелирует с комнатной температурой. Оптимальная температура 21.5 °C.
10. Рекомендуется выполнять исследование в дублях для уменьшения ошибки пипетирования.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ И СРОКУ ГОДНОСТИ

1. Набор храните при температуре 2-8°C. **Не замораживайте реагенты и компоненты набора.**
2. Нераспечатанные реагенты стабильны до истечения срока годности набора. Внимание: После вскрытия упаковки срок годности реагентов намного меньше указанного на этикетке. Закрывать все реагенты сразу же после использования, хранить при 2-8 °C и использовать **в течение 4 недель**. В противном случае результаты могут быть недостоверными.
3. Разведенный промывающий раствор стабилен в течение 4 недель при температуре 2-8°C.
4. Разведенный экстракционный буфер может храниться при 2-8°C на протяжении 4 недель.
5. Закрывайте флаконы с реагентами сразу после использования.
6. Храните стрипы микропланшета в пакете с осушителем. Оставшиеся неиспользованными стрипы также храните в плотно закрытом пакете с осушителем. При соблюдении данных условий стрипы стабильны не менее 4 недель после первого использования.

ОБРАЗЦЫ

Фекалии человека

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Используйте свежие образцы. Обращайтесь с ними как с инфекционно опасными.
2. Образец остается стабильным при хранении:
 - до 40°C в течение 5 дней,
 - при 2-8°C в течение 7 дней,
 - при замораживании до -18 - -20°C хранится 1 год.
3. Процедура для жидкого стула

В случае жидкого стула, взять другой образец в более густой консистенции, или, если это невозможно, нагреть образец жидкого

стула на водной бане до 55°C, при которой эластаза не денатурирует и концентрировать образец до нормальной консистенции.

Внимание! Не существует методов, гарантирующих отсутствие любых инфекционных агентов, включая вирус гепатита В, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV) в реагентах этого набора. Следовательно, все биологические образцы человеческого происхождения, в том числе образцы фекалий, необходимо считать потенциально инфекционно опасными.

Приготовление образцов фекалий

1. Подготовка Экстракционного Буфера (10 x концентрация):

- Развести концентрат Экстракционного Буфера в 10 раз дистиллированной водой (50 мл + 450 мл). Разведённый раствор может храниться при 2 - 8 °C 4 недели.

2. Взвешивание образцов фекалий

- Используйте стаканчики или пробирки объёмом 12 мл со шпателем (или с инокуляционной петлёй) для взвешивания 30 – 100 мг фекалий на весах с чувствительностью не менее 1 мг. Добавьте 1 мл разведённого Экстракционного Буфера в расчёте на 10 мг фекалий (например, к 70 мг фекалий добавить 7 мл буфера или к 83 мг фекалий добавить 8,3 мл буфера).

- Полностью гомогенизируйте образцы, используя вортекс (2 минуты). После осаждения нерастворившихся компонентов (минимум 15-30 минут), супернатант может быть использован для определения Эластазы после разведения. Лучшие результаты наблюдаются при использовании экстракции в течение ночи при 2-8 °C.

Внимание: если в экстракционном растворе или промывочном растворе соль выпадает в осадок, растворить соль встряхиванием и подогреванием в теплой воде при 30-35 °C перед использованием. Для проведения анализа позже, супернатанты могут быть заморожены при -18 °C на 4 недели. Строго необходимо отделить супернатанты от осадков для хранения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Подготовка Промывочного Буфера (10 x концентрация): Концентрированный промывочный раствор (50 мл) разбавить с 450 мл дистиллированной или деионизированной водой. **Внимание:** Не использовать воду из-под крана!
- Все реагенты и образцы доведите до комнатной температуры перед использованием.
- Установить требуемое число сорбированных антителами стрипов в рамку.
- Супернатант экстрагированных фекалий необходимо развести 1:201 (1+200) Промывочным Буфером (например, 25 мкл супернатанта + 5 мл Промывочного Буфера). Перемешать. Разведённый раствор готов для использования. Используйте новый наконечник для каждого образца.
- Добавить по 50 мкл Промывочного Буфера (нулевой стандарт), стандарты эластазы, контроли, экстрагированные и разведённые образцы фекалий в соответствующие лунки, используя одноразовые наконечники.
- Инкубировать 60 минут при комнатной температуре (18-25°C).
- Энергично встряхнуть реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл Промывочным Буфером.
- Удалить остатки воды из лунок, ударяя их (в держателе) об впитывающую бумагу.
- Развести биотинилированные вторые антитела анти-эластазы 1:201 Промывочным Буфером (1 часть биотинилированного антитела + 200 частей промывочного раствора). Например:
 - 5 мкл биотинилированного антитела анти-эластазы в 1 мл промывочного раствора (для 2 полосок)
 - 10 мкл биотинилированного антитела анти-эластазы в 2 мл промывочного раствора (для 4 полосок)
 - 15 мкл биотинилированного антитела анти-эластазы в 3 мл промывочного раствора (для 6 полосок)
 - 25 мкл биотинилированного антитела анти-эластазы в 5 мл промывочного раствора (для 10 полосок), которые сейчас готовы к использованию. Поместить 50 мкл в каждую лунку.
 Внимание: биотинилированное антитело должно быть свежеприготовленным перед каждым проведением теста.
- Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (18-25°C).

- Удалить реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл Промывочным Буфером.
- Удалить остатки воды из лунок, ударяя их (в держателе) об впитывающую бумагу.
- Добавить 50 мкл стрептавидин-пероксидазного конъюгата (готов для использования) в каждую лунку.
- Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (18-25°C).
- Удалить реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл Промывочным Буфером.
- Удалить остатки воды из лунок, ударяя их (в держателе) об впитывающую бумагу.
- Добавить 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку.
- Инкубировать 20 минут при комнатной температуре (18-25°C) (**Внимание:** заметьте время после добавления субстратного раствора в первую лунку).
- Остановить ферментную реакцию добавлением 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку в той же последовательности и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Это принципиальный момент, т.к. небольшие различия во времени инкубации могут привести к разнице в цветной реакции.

Измерить оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм. Считывание должно быть выполнено не позднее 10 минут после останова ферментной реакции. Может использоваться любая из 96 лунок. Рекомендуется контрольное измерение при длине волны ≥ 550 нм.

СХЕМА ПИПЕТИРОВАНИЯ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34
B	S	1	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
C	S	2	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
D	S	3	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
E	S	4	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
F	C	1	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
G	C	2	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40
H	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33	P	41

В этой схеме пипетирования рекомендованные позиции для "blank" (нулевой стандарт), стандарты (S1-S4), контроли (C1C2), и для образцов пациентов (P1-P41) показаны в двойном определении.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рекомендуется использовать линейную регрессию, используя четырех параметрическую кривую.
- Подсчитать средние значения оптической плотности всех стандартов, контролей и образцов.
- По оси (Y) откладывается оптическая плотность каждого стандарта, а по оси (X) соответствующая концентрация стандарта эластазы.
- Используйте оптическую плотность каждого образца для расчета концентрации по стандартной кривой.
- Значение Контроля 1 должно быть в пределах 70-110 мкг/г и Контроля 2 – 160-240 мкг/г. Если значения выходят за указанные пределы, тест повторить. В этом случае проверьте все шаги инкубации и времена.

В общем, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре. Это делает интерполяцию возможной для установленных физико-химических условий.

Если при проведении теста плотность 500-мкг/г-стандарта ниже, чем 1.5, время инкубации финальной ферментной реакции может быть продлено.

Если, с другой стороны, плотность 500-мкг/г-стандарта выше верхнего предела, время инкубации может быть уменьшено.

Так как калибраторы и контроли проверяются при каждом анализе, отклонения плотности не влияют на абсолютные результаты.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Если температура воздуха выше 40°C, образцы необходимо транспортировать в рефрижераторе. А также время инкубации с субстратом можно сократить (продлить).

- Образцы жидких фекалий от пациентов с диареей могут давать ложное снижение за счёт эффекта разведения. Для определения концентрации подобных образцов смотрите раздел «Забор и подготовка образца».

- Если оптическая плотность бланков выше 0.15, анализ необходимо повторить.

- Рекомендуется прервать ферментную заместительную терапию, чтобы исключить возможность кросс-реактивности с белками свиньи.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

- Тяжелая степень экзокринной недостаточности поджелудочной железы	< 100 мкг эластазы/г фекалий
- средняя степень экзокринной недостаточности поджелудочной железы	100-200 мкг эластазы/г фекалий
- нормальная функция экзокринной поджелудочной железы	> 200 мкг эластазы/г фекалий

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

1. Диагностическая Специфичность: 95%

Были исследованы образцы от 609 здоровых лиц. 78 из них были здоровыми донорами крови, у остальных 531 пациента различные заболевания поджелудочной железы были исключены с помощью других диагностических методов (ультрасонография, ERCP).

2. Диагностическая Чувствительность:

Для тяжёлых хронических панкреатитов: 94%
(ниже 100 мкг Э/г фекалий)

Исследовались образцы от 46 пациентов, страдающих тяжёлыми хроническими панкреатитами обследованных методами УЗИ и ERCP.

Для лёгких форм хронических панкреатитов: 63%
(между 100 и 200 мкг Э/г фекалий)

Исследовались образцы от 56 пациентов, страдающих лёгкими формами хронических панкреатитов обследованных методами УЗИ и ERCP.

3. Чувствительность для карциномы поджелудочной железы: 61%

Исследовались образцы от 51 пациента с карциномой поджелудочной железы, обследованных другими методами.

4. Чувствительность для муковисцидоза: 100%

Исследовались образцы от 36 пациентов с клинически диагностированным муковисцидозом.

5. Внутрисерийный коэффициент вариации

- для порога решений 100 мкг Э/г фекалий: 5,2% (4,1-6,9%)

- для порога решений 200 мкг Э/г фекалий: 4,3% (2,8-6,8%)

Два клинически значимых уровня концентраций вблизи пороговых медицинских значений, 100 и 200 мкг Э/г фекалий были проанализированы трижды в одной и той же постановке и в 2-х параллельных постановках ежедневно в течение 20 дней. Были использованы 6 наборов 6 разных лотов (произведённых в разные дни).

6. Межсерийный коэффициент вариации

- для порога решений 100 мкг Э/г фекалий: 7,7% (6,5-9,1%)

- для порога решений 200 мкг Э/г фекалий: 7,9% (7,1-8,9%)

Два клинически значимых уровня концентраций вблизи пороговых медицинских значений, 100 и 200 мкг Э/г фекалий были проанализированы трижды в одной и той же постановке и в 2-х параллельных постановках ежедневно в течение 20 дней. Для определения коэффициента вариации между сериями была использована одна полоска (8 ячеек) каждого из 12 наборов 6 разных лотов (произведённых в разные дни).

7. Линейность

Образцы с добавлением Эластазы были использованы для оценки линейности. Анализ является линейным до уровня 500 мкг/г.

8. Чувствительность метода

Минимально определяемая концентрация эластазы, измеренная как среднее плюс 2 стандартных отклонения (95% доверительный интервал) 50-кратно измеренного стандарта 0 мкг Э/г фекалий (среднее составило 2 мкг Э/г фекалий, стандартное отклонение 1,73), составляет 5,5 мкг Э/г фекалий. При использовании доверительного интервала 99,9% чувствительность составила 10 мкг Э/г.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Чорновола, 97,

г. Ивано-Франковск, 76005

тел./факс: (0342) 52-57-10

80681043216 (безлимит)

E-mail: info@biotechlab-s.com

www.biotechlab-s.com