

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА С В ЦИТРАТНІЙ ПЛАЗМІ

3901, Aeskulisa Protein C

Каталог. №: 3901

Кількість : 96

Виробник : AESKU. Diagnostics,

(Німеччина)

Методика від 02-03-2010

Версія 003



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1 Призначення

AESKULISA Protein C є твердофазним імуноферментним аналізом для кількісного визначення білка С в цитратній плазмі людини. Визначення протеїну С допомагає в оцінці ризику тромбозу.

2. Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Набір **AESKULISA Protein C** являє собою сендвіч-ELISA з використанням мікропланшетів, покритих іммобілізованим антитілом, специфічним для білка С людини. Розбавлена 1:51 плазма пацієнта інкубується в лунках, що дозволяє протеїну С, присутньому у плазмі, зв'язатись з антитілом. Незв'язана фракція видаляється промиванням. Після цього антитіла виявлення анти-людського білка С, кон'юговані з пероксидазою хрому (кон'югату), інкубують і відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло на поверхні мікропланшетів. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається. Додавання ТМВ-субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість формації кольору від хромогену вимірюється в одиницях оптичної щільності на спектрофотометрі при 450 нм. Використовуючи криву, отриману з Референсної Плазми, що входить в комплект, можна визначити відносний відсоток концентрації антигену протеїну С в плазмі пацієнта.

3. Комплект поставки

Мають бути відновлені:

5x Буфер для зразків	1 флакон, 20 мл - 5x концентрований (білий ковпачок: жовтий розчин) Містить: Тріс, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант)
50x Промивний буфер	1 флакон, 20 мл - 50x концентрований (білий ковпачок: зелений розчин) Містить: Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)
Референсна плазма	3 флакони, 0,4 мл ліофілізована Референсна Плазма Містить: плазму людини
Контроль «N»	3 флакони, 0,2 мл ліофілізована Нормальна Плазма Містить: плазму людини
Контроль «D»	3 флакони, 0,2 мл ліофілізована Дефіцитна Плазма Містить: плазму людини

Готові до використання:

Кон'югат	1 флакон, 15 мл IgG (синій ковпачок: синій розчин) Містить: Антитіла Протеїну С людини, кон'юговані з пероксидазою хрому
Субстрат ТМВ	1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок) Містить: стабілізований ТМВ/H ₂ O ₂
Стоп Розчин	1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин) Містить: 1 М соляної кислоти
Мікропланшет	12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються Покриття див. пункт 1

Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для

розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.

Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur. Ph. 4-е вид).

4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини, за винятком Референсної Плазми і Контролів, стабільні протягом 1 місяця при температурі 4 °C, як мінімум. Після відновлення Референсна Плазма і Контролі є стабільними протягом 8 годин при зберіганні при 2-8 °C/ 35-46 °F. **Реагенти і мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.**

5. Заходи безпеки використання

5.1 Небезпека для здоров'я

Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтеся наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички. УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN₃) як консервант. NaN₃ може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN₃ може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів. Не паліть, не їжте і не пийте при роботі з набором. Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

Не змішуйте і не замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-26 °C/68-78.8 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 23 °C/73.4 °F для автоматизованих систем.

Ніколи не піддавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки проведеного тесту, але має бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

Діагноз повинен бути перевірений з використанням різних методів діагностики.

6. Відбір проб, Використання та зберігання

Використати переважно свіжозібрані зразки плазми з 3.2% або 3.8% цитрату натрію в якості антикоагулянту. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог. Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати відразу, зберігати щільно закритими при

температурі 2-8 °C/35-46 °F до 8 годин і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7. Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для взірців 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Референсна плазма:

Відновити Референсну Плазму шляхом додавання 0.4 мл дистильованої води і потрусити. Залишити відновлену плазму на 10 хвилин при кімнатній температурі перед використанням. Референсна Плазма стабільна протягом 8 годин при температурі 2-8 °C/ 35-46 °F.

Контролі:

Відновити Контроль N і Контроль D, додавши 0.2 мл дистильованої води і потрусити. Залишити відновлені контролі на 10 хвилин при кімнатній температурі перед використанням.

Контролі залишаються стабільними протягом 8 годин при температурі 2-8 °C/35-46 °F.

Попереднє розбавлення Референсної Плазми:

Приготуйте 1:2 розбавлення відновленої Референсної Плазми у попередньо розведеному буфері для зразків (1x) 2 і добре перемішати, наприклад, 100 мкл буфера для зразків + 100 мкл плазми.

Підготовка референсної кривої:

Набір розведень отримують за допомогою розведеної Референсної Плазми.

Об'єм референсної плазми	Об'єм Буфера для зразків	Референсний рівень
60 мкл	1000 мкл	150%
40 мкл	1000 мкл	100%
30 мкл	1000 мкл	75%
20 мкл	1000 мкл	50%
10 мкл	1000 мкл	25%
10 мкл	2000 мкл	12.5%

Розведення Зразків і Контролів:

Додати 20 мкл плазми до 1000 мкл буфера для зразка (1x) і добре перемішати.

Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок (наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води).

Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекаати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для випробування. Видалити зайві лунки з рами, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, (2-8 °C/35-46 °F).

7.2 Проведення тестування

Схема піпетування: див. Додаток А, процедура випробування: див. Додаток В Ми рекомендуємо піпетування зразків, Контролів і робочих розведень Референсної Плазми у двох примірниках.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки.
- Внесіть 100 мкл кожного робочого розведення Референсної Плазми і розбавлених Контролів у призначених лунки.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F.
- Промийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).

- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрат в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F, захищеному від інтенсивного світла.
- Внесіть 100 мкл стоп розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, як при піпетуванні субстрату.
- Інкубуйте 5 хвилин мінімум.
- Агітувати пластину ретельно протягом 5 сек.
- Зчитати абсорбцію при 450 нм (опційно 450/620 нм) протягом 30 хвилин.

8. Кількісна Інтерпретація

Для **кількісної інтерпретації** побудувати стандартну криву, відклавши **оптичну щільність (ОЩ) кожного розведення Референсної Плазми (у-вісь) проти відповідного значення Референсного рівня у % (вісь х)**. Для отримання найкращих результатів ми рекомендуємо координати log/lin і 4-параметрову функцію. З ОЩ кожного зразка зчитайте відповідне відносне значення пацієнта, виражене у %. Помножити відносне значення пацієнта, отримане з референсної кривої за допомогою призначеного фактора, зазначеного у листку контролю якості, щоб обчислити рівень протеїну С антигену у % від нормального.

Приклад стандартної кривої

Ми рекомендуємо піпетувати кожне розбавлення Референсної плазми паралельно для кожного прогону.

Референсний Рівень	OD 450/620 нм	Результати (%)	CV % (Варіація)
12.5%	0.569	11.95	1.05
25%	0.874	26.68	0.94
50%	1.163	48.06	1.04
75%	1.434	77.70	0.97
100%	1.583	99.61	1.01
150%	1.826	147.73	1.02

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Відносне значення (%)	Фактор	Протеїн С пацієнта (%)
P 01	0.933/0.927	0.930	31.8	0.96	30.5
P 02	1.860/1.866	1.863	112.3	0.96	107.8

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контролі і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.

Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

Очікувані значення

Значення білка С наведені у відносних відсотках (%) порівняно з об'єднаною нормальною плазмою. Концентрація білка С в нормальній людській плазмі коливається, як правило, від 70% до 140%.

Зразки зі значеннями вище діапазону еталонної кривої можуть бути оцінені знову при більш високих розведеннях для точних результатів. Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

9. Технічні дані

Матеріал зразка:	плазма
Об'єм зразка:	20 мкл плазми, розведеної 1:51 в 1x буфері для зразків
Загальний час інкубації:	90 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F
Діапазон калібрування:	12.5 – 150 %
Аналітична чутливість:	6.0 %
Зберігання:	при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони
Кількість визначень:	96 тестів

10. Дані продуктивності

10.1 Аналітична Чутливість

Тестування буфера для зразків 30 разів на *Protein C* дало аналітичну чутливість 6.0 %.

10.2 Специфічність і чутливість

Мікропланшет покритий антитілами, специфічними для Протеїну С людини.

10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (%)	Очікувана концентрація (%)	Відновлення (%)
1	1/50	115.3	120	96.1
	1/100	60.88	60	101.5
	1/200	31.71	30	105.7
2	1/400	14.41	15	96.1
	1/50	41.47	40	103.7
	1/100	19.86	20	99.3
	1/200	9.48	10	94.8
	1/400	4.85	5	97.0

10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою.

Intra-Assay		
Sample No.	Mean (%)	CV (%)
1	115.0	5.3
2	93.0	1.7
3	27.0	2.1

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (%)	CV (%)
1	116.2	2.4
2	43.3	7.4
3	8.1	3.7

10.5 Калібрування

Цей кількісний аналіз калібрується проти другого міжнародного стандарту ВООЗ для білка С. Значення дані в відносних відсотках (%) порівняно з об'єднаною нормальною плазмою.

ДОДАТОК А: Схема піпетування

Ми пропонуємо піпетувати робочі розведення Референсної Плазми, контролів і зразків наступним чином:

Для кількісної інтерпретації використовувати робочі розведення Референсної Плазми для побудови стандартної кривої.

for quantitative interpretation use the working dilutions of the Reference Plasma to establish a standard curve												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	150	25	P1									
B	150	25	P1									
C	100	12.5	P2									
D	100	12.5	P2									
E	75	CD	P3									
F	75	CD	P3									
G	50	CN	...									
H	50	CN	...									

150: Референсний Рівень 150%, 100: Референсний Рівень 100%, 75: Референсний Рівень 75%, 50: Референсний Рівень 50%, 25: Референсний Рівень 25%, 12.5: Референсний Рівень 12.5%

CD: контроль «дефіцитна плазма»

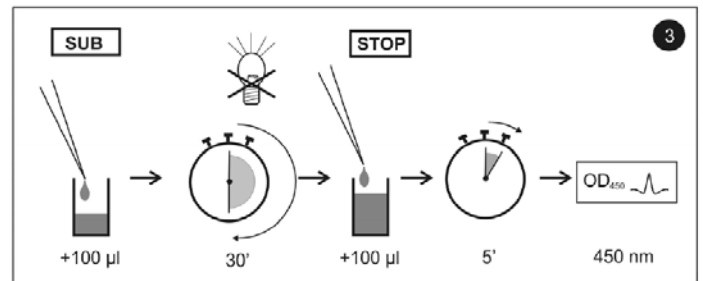
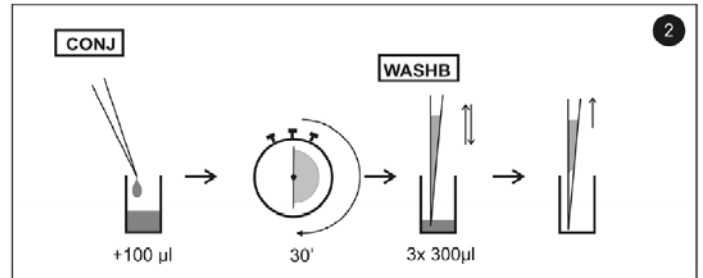
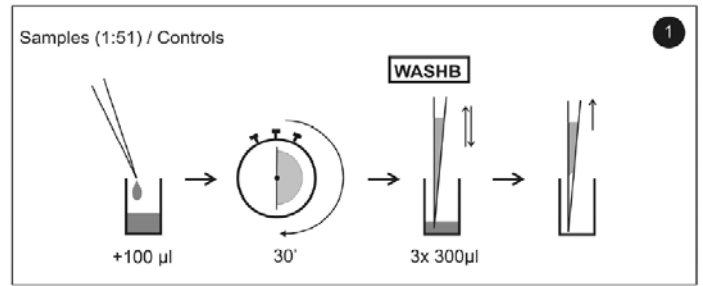
CN: контроль «нормальна плазма»

P1: пацієнт 1

P2: пацієнт 2

P3: пацієнт 3

Додаток В: Процедура випробування



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com