

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ЦИРКУЛЮЮЧИЙ ІМУННИЙ КОМПЛЕКС (CIC C3d) ELISA

CIC C3d ELISA

Каталог. №: **EIA-3170**
Кількість: **96**

Дата випуску інструкції: **2019/03**
Версія **9.0**



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний колориметричний метод для кількісного визначення концентрації Циркулюючого Імунного Комплексу C3d (CIC C3d) у людській сироватці або плазмі.

CIC C3d ІФА набір призначений тільки для лабораторного використання.

1.1. Клінічне значення

Важливість імунокомплексів (CIC) та їхній зв'язок з кількома хворобами було об'єктом досліджень протягом багатьох років.

Встановлення імунокомплексу - це нормальний захисний процес імунної системи. Циркулюючий імунокомплекс вилучається з кровообігу за допомогою різних клітинних, біохімічних та ферментативних процесів.

Ключ усунення багатьох CIC - активація класичного способу доповнення.

При деяких захворюваннях, важких для розуміння, імунокомплекс може почати пошкодження тканин і органів. У цьому випадку активація комплексу може призвести до вироблення анафілотоксину, стимуляції лейкоцитів та активації макрофагів та інших клітин.

У деяких випадках гломерулонефриту, при якому імунокомплекс фіксується до клітинних мембран, він має руйнування тканини.

Циркулюючі імунні комплекси (CIC) є у багатьох людей, які страждають на системний червоний вовчак (СКВ) та ревматоїдний артрит (РА), особливо при ураженнях ускладненнями васкуліту.

Існує багато тестів для визначення CIC, включаючи тест осадження з PEG, радіальну імунодифузю та клітинні тести, як тест клітини Рея.

Не існує єдиної процедури визначення всіх типів імунокомплексів; у продажі доступні деякі тести на визначення фрагментів комплексу (наприклад, C1q та C3d), які мають важливе діагностичне значення.

2. ПРИНЦИП

C3d циркулюючі імунні комплекси (CIC) спочатку блокуються анти-C3d, іммобілізованим на мікропланшеті. Під час цієї фази імунокомплекс зв'язується з антитілами анти C3d, нанесеними на мікропланшет. Мікропланшети промивають для видалення незв'язаного білка сироватки.

У другій фазі додають антитіла до людського IgG, кон'юговані з пероксидазою; вони зв'язуються з імунокомплексом, закріпленим на мікропланшеті. Миючий розчин видалляє незв'язаний кон'югат. На третій фазі додається субстрат TMB і реагує з кон'югатом, закріпленим на мікропланшеті.

Кількість комплексу CIC IgG пропорційна інтенсивності кольору, що читається на довжині хвилі 450 нм.

Концентрацію імунокомплексу у зразку можна виміряти через калібрувальну криву.

«Тепловий агрегат людського гамма-глобуліну на мл "(мкг-екв./мл) є одиницею вимірювання результатів.

3. РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЙ

3.1 Матеріали, які постачаються у набір

1. CIC C3d Стандарти S0 -S2 (3 флакони, 1,5 мл кожен)
2. **Негативний контроль** (1 флакон, 1,5 мл)
Позитивний контроль (1 флакон, 1,5 мл)
3. **Інкубаційний буфер** (1 флакон, 50 мл)
Фосфатний буфер 74 мМ рН 7,4; БСА 1 г/л
4. **Ферментний кон'югат** (1 флакон, 0,5 мл)
Антитіла до IgG людини, кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP)
5. **Кон'югований буфер** (1 флакон, 20 мл)
Фосфатний буфер 74 мМ рН 7,4; БСА 1 г/л

Перекладач Романюк Н.П.

6. **Мікротитрові лунки** (1 мікропланшет розділений на окремі лунки)
Анти-C3d антитіла покриті на планшеті
7. **Розчин субстрату** (1 флакон, 15 мл)
H₂O₂ ТМБ 0.26 г/л (уникати попадання на шкіру)
8. **Стоп-розчин** (1 флакон, 15 мл)
Сірчана кислота 0.15 моль/л (уникайте попадання на шкіру)
9. **Миючий розчин**
Фосфатний буфер 0.2 М, рН 7.4

3.2 Необхідні реагенти, які не постачаються:

- Дистильована вода

3.3 Допоміжні матеріали та інструментарій

- автоматичний дозатор.
- мікропланшетний зчитувач (450 нм, 620-630 нм)

Примітка

Зберігати реагенти при температурі 2-8°C у темному місці.

Відкривати упаковку реагенту 6 (покритий мікропланшет) тільки тоді, коли він досягнув кімнатної температури та негайно закривати після використання. Після відкриття, мікропланшет стабільний до закінчення терміну придатності набору.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для in vitro використання тільки фахівцями. Не для внутрішнього чи зовнішнього застосування людям або тваринам.
- Під час роботи з даними реагентами використовувати відповідне захисне обладнання.
- Дотримуватися Відповідної лабораторної практики (GLP) під час обробки продуктів крові.
- Всі матеріали людського походження, які використані у приготуванні реагентів були протестовані та є негативними на антитіла до ВІЛ 1 та 2, HbsAg та HCV. Жоден метод тестування не може гарантувати повну відсутність HIV, HBV, HCV або інших інфекційних збудників. Тому, з реагентами слід поводитися так, як з потенційно інфекційним матеріалом.
- Матеріал тваринного походження, який використовувався для підготовки набору було отримано від тварин, сертифікованих як здорові, а коров'ячий білок був отриманий з країн, не заражених BSE, але з цими матеріалами слід поводитися як з потенційно інфекційними.
- Деякі реагенти містять невеликі кількості Proclin 300® в якості консерванту. Уникайте попадання на шкіру або слизові.
- ТМБ субстрат містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, поглинанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб запобігти травмі, уникайте вдихання, проковтування та попадання на шкіру та очі.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота отруйна та агресивна, та може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу прямого сонячного світла, металів та окисників на реагент ТМБ/H₂O₂. Розчин не заморожувати.
- Цей метод дозволяє визначити Вільний Тестостерон від 0.2 пг/мл до 100.0 пг/мл.
- Клінічне значення визначення Вільного Тестостерону може бути визнано недійсним, якщо пацієнт лікувався кортизоном або природними чи синтетичними стероїдами.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Будь ласка, чітко дотримуйтеся послідовності кроків піпетування, передбачених у цьому протоколі. Дані про ефективність були отримані за допомогою використання специфічних реагентів, які перелічені у цій інструкції з використанням.
- Всі реагенти слід зберігати у холодильнику при температурі 2°C - 8°C в оригінальному контейнері. Будь-які винятки чітко вказані. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності за умови зберігання та використання як зазначено.
- Дозволити всім компонентам набору та зразкам досягнути кімнатної температури (22-28°C) та добре перемішати перед використанням.
- Не замінювати компоненти набору з різних лотів. Дивитися термін придатності, який надрукований на етикетках упаковки або на флаконах. Не використовувати компоненти набору у яких закінчився термін придатності.
- **ПОПЕРЕДЖЕННЯ: кон'югатний реагент призначений для забезпечення максимальної дози чутливості та може бути**

забруднений зовнішніми збудниками при неправильному використанні; крім того, рекомендується використовувати одноразові витратні матеріали (наконечники, пляшки, лотки та ін.).

Для розділених доз, візьміть необхідну кількість кон'югату і залишки не виливати назад у пляшку. Крім того, **для доз, відпущених за допомогою автоматичних та напівавтоматичних пристроїв**, перед використанням кон'югату доцільно очистити систему обробки рідини, забезпечивши ефективність процедур промивання, депротейнізації та дезактивації, щоб уникнути забруднення кон'югату; **ця процедура рекомендується, коли набір обробляється за допомогою аналізаторів, які не оснащені наконечниками для одноразового використання.** Для цього, компанія DRG постачає окремий знезаражуючий реагент для очищення голок.

- Якщо ви використовуєте автоматичне обладнання, користувач несе відповідальність за те, що набір був протестований належним чином.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу та / або збільшити фон. Для того, щоб збільшити продуктивність набору на автоматичних системах ІФА, рекомендується збільшити кількість промивань.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці був незмінним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути збоїв в аналізі. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтесь того ж порядку видачі. Якщо використовуються більше ніж планшет, рекомендується повторити криву реакції на дозу в кожному планшеті.
- Додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка закінчується після додавання стоп-розчину. Таким чином, ТМБ субстрат та Стоп-розчин потрібно додавати в однаковій послідовності, щоб усунути будь-які відхилення в часі під час реакції.
- Дотримуйтесь вказівок щодо здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контролю та/або змішаної сироватки.
- Максимальна точність потрібна для відновлення та дозування реагентів.
- Мікробіологічно забруднені, високоліпемічні та гемолізовані зразки не можна використовувати в аналізі.
- Зчитувачі планшетів вимірюють вертикально. Не торкатися нижньої частини пробірок.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Підготовка калібраторів

Калібратори готові до використання та мають наступні концентрації:

	S0	S1	S2
Мкг-екв./мл	0	16	64

Після відкриття, калібратори стабільні 6 місяців при температурі 2°C - 8°C.

6.2 Підготовка розведеного кон'югату

Розведіть концентрований Ферментний Кон'югат (реагент 4) **1:100** з Кон'югованим буфером (реагент 5). Кількість розведеного Кон'югату пропорційна кількості тестів. Добре перемішайте та уникайте утворення піни. Стабільний протягом 3 годин при температурі від 22°C до 28°C.

6.3 Підготовка промивного розчину

Перед використанням розбавити вміст флакону «Промивного розчину» дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл. Для менших об'ємів дотримуватися співвідношення розведення 1:10.

Розведений промивний розчин стабільний протягом 30 днів при температурі 2°C - 8°C.

У концентрованому миючому розчині можна спостерігати наявність кристалів. У такому випадку перемішайте його при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів. Для більшої точності, повністю розведіть дві баночки концентрованого миючого розчину до 500 мл, також перенісши кристали, потім перемішайте до повного розчинення кристалів.

6.4 Підготовка зразка

Аналіз ЦІК можна виконувати у людській сироватці та плазмі.

Зразки, які зразу не використовуються (протягом 24 годин), потрібно зберігати при температурі -20°C. Зразки не можна розморожувати більше одного разу.

Піпетувати у тест-пробірку:

Сироватка/плазма 10 мкл
Інкубаційний буфер 500 мкл

Обережно перемішати. Не використовувати вортекс.

6.5 Процедура аналізу

Довести усі реагенти до кімнатної температури (22°C - 28°C)

Перекладач Романюк Н.П.

щонайменше протягом 30 хвилин.

Наприкінці аналізу, зберігати реагенти при температурі 2°C - 8°C: уникаючи довготривалого впливу кімнатної температури. Не використані покриті мікролункові стрипи потрібно надійно вивільнити в алюмінієвій упаковці з осушувачем та зберігати при температурі 2°C - 8°C. Уникаючи потенційно мікробного і/або хімічного забруднення, невикористані реагенти не можна ставити назад в оригінальну упаковку.

Необхідно проводити визначення у дублікаті. Для того, щоб вдосконалити точність результатів тестів, підготуйте дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (S0-S2), дві для кожного Контролю, дві для кожного зразка і одну для Бланку.

Реагенти	Стандарт	Зразок/Контролі	Бланк
Стандарт S0-S2	100 мкл		
Контролі		100 мкл	
Розведений зразок		100 мкл	
Інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37°C. Видалити вміст з кожної лунки, тричі промити лунки з 300 мкл розведеного миючого розчину. Важлива примітка: під час кожного етапу миття, обережно потрусить планшет протягом 5 секунд та видалити зайвий розчин, постукуючи перевернутим планшетом об абсорбуючий паперовий рушник. Автоматичний вошер: якщо використовуєте автоматичне обладнання, мийте лунки щонайменше 5 разів.			
Розведений кон'югат	100 мкл	100 мкл	
Інкубувати 30 хвилин при температурі 37°C. Видалити вміст з кожної лунки, тричі промити лунки з 300 мкл розведеного миючого розчину. Миття: дотримуватися вказівок з попереднього пункту.			
ТМБ субстрат	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати 15 хвилин у темряві при кімнатній температурі (22°C - 28°C).			
Стоп-розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обережно потрусить планшет. Зчитайте абсорбцію (E) при 450 нм до референсної довжини хвилі 620-630 нм або до Бланку протягом 5 хвилин.			

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролі при нормальному, високому та низькому рівнях діапазону СІС С3d для моніторингу процедури аналізу. Ці контролі слід розглядати як невідомі, а значення будуть визначені у кожній проведеній процедурі тесту. Таблиці контролів якості слід вести для того, щоб слідувати за продуктивністю реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Кожна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від встановлених показників може вказувати на непомітні зміни експериментальних умов або деградацію наборів реагентів. Для визначення причини виникнення змін слід використовувати свіжі реагенти.

8. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

8.1 Середнє значення абсорбції

Обчисліть середнє значення абсорбції (Em) для кожної точки стандартної кривої та кожного зразка.

8.2 Стандартна крива

Визначіть середнє значення абсорбції (Em) Стандартів (S0-S5) відносно концентрації. Проведіть криву через визначені точки. (Напр. Four Parameter Logistic or Point-to-Point regression).

8.3 Обчислення результатів

Інтерполюйте значення зразків на стандартній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій виражених у мкг-екв./мл.

9. РЕФЕРЕНСНІ ЗНАЧЕННЯ

	мкг-екв./мл аргентів IgG
Негативний зразок	<16
Невизначений зразок	між 16-18
Позитивний зразок	>18

Будь ласка, зверніть увагу на той факт, що визначення діапазону очікуваних значень для «нормальної» популяції в даним методом залежить від багатьох факторів, таких як специфіка та чутливість використовуваного методу та

типу досліджуваної сукупності.

Тому, кожна лабораторія повинна розцінювати діапазон, що надається виробником, як загальну ознаку та виробляти власний діапазон очікуваних значень на основі корінного населення, де працює лабораторія.

10 ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точність

10.1.1 Варіація в аналізі

Варіація в аналізі була визначена вимірюваннями реплікантів (16X) двох різних зразків сироватки в одному аналізі. Варіація в аналізі становить $\leq 6.1\%$.

10.1.2 Варіація між аналізами

Варіація між аналізами була визначена вимірюваннями реплікантів трьох різних контрольних сироваток у 2 різних лотах. Варіація між аналізами становить $\leq 13.9\%$.

10.2 Правильність

Відновлення 12.5 – 25 – 50 мкг-екв./мл СІС С3d, додане до зразка «без сироватки», дало середнє значення (\pm СВ) $99.84\% \pm 5.07\%$ з посиланням на вихідні концентрації.

10.3 Чутливість

Найнижча концентрація СІС С3d, яку можна визначити із нульового стандарту становить 0.60 мкг-екв./мл при 95% довірчої межі.

11. ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти слід утилізувати відповідно до місцевих правил.

12. БІБЛІОГРАФІЯ

(Дивитися в оригіналі інструкції)

13. УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

ЙМОВІРНІ ПРИЧИНИ ПОМИЛОК/ПРИПУЩЕННЯ

Відсутня колориметрична реакція

- Відсутність реакції після додавання кон'югату
- Забруднення кон'югатів і/або субстрату
- Помилки у проведенні процедури аналізу (напр. випадкове піпетування реагентів у неправильні послідовності або не з того флакону, та ін.)

Дуже слабка реакція (дуже низькі ОЩ)

- Неправильний кон'югат (напр. не з оригінального набору)
- Дуже короткий час інкубації, дуже низька температура інкубації

Дуже сильна реакція (дуже високі ОЩ)

- Неправильний кон'югат (напр. не з оригінального набору)
- Занадто довгий час інкубації, занадто висока температура інкубації
- Низька якість води для промивного буфера (низький рівень деіонізації)
- Недостатнє промивання (кон'югати не були повністю видалені)

Незрозумілі результати

- Забруднені піпетки, наконечники або контейнери
- Недостатнє промивання (кон'югати не були повністю видалені)

Дуже високе значення КВ% в аналізі

- Перед використанням реагенти і/або смужки не були попередньо нагріті до кімнатної температури
- Вошер планшетів не працює належним чином (порада: почистити головку вошера)

Дуже високе значення КВ% між аналізами

- Умови інкубації не постійні (час, температура)
- Контролі та зразки надані одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірити порядок піпетування)
- Людський фактор



ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмБХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

