

**НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ α_1 -АНТИТРИПСИНА**

Набор для количественного определения α_1 -Антитрипсина в образцах сыворотки, плазмы и кала человека

Каталог. № : K6752
Количество : 96
Производитель : Immundiagnostik AG (Германия)

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

Методика от 02-05-2011

Для диагностического использования в *in-vitro* диагностике

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ предназначен для количественного определения α_1 -Антитрипсина в образцах сыворотки, плазмы и кала человека. Только для диагностики In-Vitro.

2. ВВЕДЕНИЕ

α_1 -антитрипсин является основным ингибитором эластазы полиморфных ядерных нейтрофильных гранулоцитов (PMN) и выделяется при воспалительных процессах в целях снижения протеолитической активности PMN-эластазы в очаге воспаления. Кроме того, он подавляет с помощью формирования комплекса ряд сериновых протеиназ, таких, как протеиназа свертывания крови, трипсин, химотрипсин и др. Таким образом, α_1 -антитрипсин играет важную регулируемую и противовоспалительную роли.

α_1 -антитрипсин является линейным гликопротеином с молекулярной массой ок. 52 кДа (394 аминокислотных радикала), свободный радикал цистеина и три побочных цепи углеводов. Он преимущественно синтезируется в печени, а также кишечными макрофагами, моноцитами и эпителиальными клетками. Несмотря на то, что α_1 -антитрипсин является основным ингибитором сериновой протеиназы в плазме крови человека, подтверждение фекального α_1 -антитрипсина стало важным маркером при кишечной потере белка и проницаемости, так как она способна противостоять деградации в кишечнике благодаря его анти-протеолитической активности. Поэтому он будет оставаться нетронутым, и существует возможность обнаружить его в фекалиях с использованием иммуноферментного анализа. Кроме того, измерение концентрации фекального α_1 -антитрипсина используется для оценки и мониторинга хронических воспалительных заболеваний кишечника. В повседневной клинической практике, очистка α_1 -антитрипсина (соотношение α_1 -антитрипсин-ИФА-значений стула и образцов сыворотки) была создана наряду с определением 24 часовой секреции α_1 -антитрипсина в стуле. Таким образом, группа J. S. Fordtran (Strygler et al. 1990) сообщает, что определение концентрации α_1 -антитрипсина в кале дало ложные положительные или ложные отрицательные результаты в 21% случаев у пациентов по сравнению с измерениями α_1 -антитрипсин-очистки.

В сравнительном исследовании с использованием радиальной иммунодиффузии (RID), которая обычно используется в клинической диагностике, α_1 -антитрипсин-ELISA, разработанный Immundiagnostik, продемонстрировал значительные преимущества в анализе сыворотки, стула и Сасо-2-клеточной культуры супернатантов (Faust et al. 2001):

1) Концентрации α_1 -антитрипсина, полученные методом ИФА, были в среднем на 30% выше, чем соответствующие значения при измерениях радиальной иммунодиффузией.

2) Только ИФА-система обнаружила α_1 -антитрипсин в клеточной культуре супернатантов.

Результаты ясно показывают, что наш α_1 -антитрипсин-ИФА-тест является более чувствительным, чем другие, обычно используемые методы, и что он **выявляет как печеночную, так и тонкокишечную форму α_1 -антитрипсина**. Этот недавно разработанный тест представляет собой многообещающую альтернативу использованию текущих клинических методов. Он превосходит радиальную иммунодиффузию, особенно в случаях с чрезвычайно высокими потерями белка через кишечник. Сочетание двух специфических антител исключает в значительной степени вероятность ложного отрицательного результата, что гарантирует надежный диагноз. Этот недавно разработанный тест является не инвазивным, простым методом по обнаружению потери белка через кишечник.

Показания

- Кишечная потеря белка и кишечная проницаемость
- Болезнь Крона
- Некротический энтероколит
- Вирусные, бактериальные или аллергические воспаления

3. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Кат. №	Содержание	Компоненты набора	Кол-во
K 6752MTP	PLATE	Один держатель с предварительно покрытыми полосками	12 x 8 лунок
K 6752WB	WASHBUF	Промывочный концентрат 10x	2 x 100 мл
K 6752PV	SAMPLEBUF	Буфер для разведения образцов, готов к использованию	2 x 70 мл
K 6752K	CONJ	Конъюгат, (овечий α_1 -антитрипсин, меченый пероксидазой)	200 мкл
K 6752ST	STD	Калибраторы, готовы к использованию (0; 3.3; 10; 30; 90 мкг/л)	5 флаконов
K 6752KO1	CTRL	Контроль, готов к использованию	1 флакон
K 6752KO2	CTRL	Контроль, готов к использованию	1 флакон
K 6752TMB	SUB	ТМБ субстрат, готов к использованию	1 x 15 мл
K 6752AC	STOP	Стоп раствор, готов к использованию	1 x 15 мл

4. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Бидистиллированная вода (аква-бидистиллированная)
- Лабораторные весы
- Прецизионные пипетки и одноразовые наконечники 10-1000 мкл
- Фольга для накрывания микропланшета
- Горизонтальный микропланшетный шейкер
- Многоканальный дозатор или повторный дозатор
- Центрифуга со способностью 3000 x g
- Мешалка Vortex
- Инкубатор с подогревом 90 °C
- Стандартные лабораторные стеклянные или пластиковые флаконы, пробирки и т.д.
- Микропланшетный ридер при 450 нм (контрольная длина волны 620 или 690 нм)

5. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Чтобы провести тест несколько раз, убедитесь, что реагенты хранятся в условиях, указанных на этикетке. **Подготовьте только соответствующее количество, необходимое для каждого анализа.** Набор может использоваться до 4 раз до окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Реагенты с объемом менее **100 мкл** следует центрифугировать перед использованием, чтобы избежать потери объема.
- **WASHBUF** (буфер для отмывки, концентрат) следует разбавить аква-бидистиллированной водой **1:10** перед использованием (100 мл WASHBUF + 900 мл аква-бидистиллированной воды), тщательно перемешать. Кристаллы могут присутствовать из-за высокой концентрации соли в основных растворах. Кристаллы должны быть растворены при 37 °C с помощью водяной бани перед разбавлением. **Концентрат буфера стабилен при 2-8 °C** до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разведенный **буферный раствор** можно хранить в закрытой колбе при температуре **2-8 °C в течение одного месяца**.
- **STD** (стандарты) и **CTRL** (контроли) стабильны при температуре **2-8 °C** до окончания срока годности, указанного на этикетке.
- **CONJ** (конъюгат) должен быть разведен **1: 100** в промывочном буфере (100 мкл CONJ + 9900 мкл промывочного буфера). Не разбавленный конъюгат стабилен при **2-8 °C** до окончания срока годности, указанного на этикетке. **Разведенный конъюгат не является стабильным и не может быть оставлен на хранение.**
- Все другие реагенты теста готовы к использованию. Тестовые реагенты стабильны до окончания срока годности (см. этикетку тестового пакета) при температуре **2-8 °C**.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**Экстракция образца кала**

Промывочный буфер используется в качестве буфера для экстракции образца. Мы рекомендуем следующую подготовку образца:

- Мы рекомендуем использовать набор для подготовки образца стула для дозирования 100 мг кала (например, набор для подготовки образца кала от Roche Diagnostics, Мангейм, Германия, кат.№ 745804). Образец кала должен быть оставлен в 5 мл буфера.

Постоянный объем буфера: 5 мл

Постоянный коэффициент разбавления: 1:50

- В противном случае, образцы стула можно вручную взвесить в диапазоне 80-120 мг. Пожалуйста, отметьте точное количество образца!

- Добавьте **5 мл** буфера к образцу кала не зависимо от объема образца.

Постоянный объем буфера: 5 мл

Коэффициент разбавления варьируется в зависимости от объема образца, который должен быть рассмотрен в дальнейших расчетах, как показано ниже:

Вес (мг)	Фактор разбавления	Вес (мг)	Фактор разбавления
80	62.5	102	49.0
82	60.9	104	48.1
84	59.5	106	47.2
86	58.1	108	46.3
88	56.8	110	45.5
90	55.6	112	44.6
92	54.3	114	43.9
94	53.2	116	43.1
96	52.1	118	42.4
98	51.0	120	41.6
100	50		

- Объем буфера** для отдельных образцов изменяется в зависимости от количества образца (см. таблицу). Коэффициент разбавления остается постоянным.

Переменный объем буфера

Постоянный коэффициент разбавления: 1:50

Таким образом, тот же коэффициент разбавления может быть использован для всех образцов в последующей оценке результатов.

Вес (мг)	Объем буфера (мл)	Вес (мг)	Объем буфера (мл)
80	4.0	102	5.1
82	4.1	104	5.2
84	4.2	106	5.3
86	4.3	108	5.4
88	4.4	110	5.5
90	4.5	112	5.6
92	4.6	114	5.7
94	4.7	116	5.8
96	4.8	118	5.9
98	4.9	120	6.0
100	5.0		

Затем смешайте образец стула и буфера; перемешайте, по крайней мере, в течение 30 секунд, в зависимости от консистенции стула. Переместите ок. 1 мл суспензии стула в трубку Eppendorf и центрифугируйте в течение 5 минут при 13000 оборотов в минуту (= 13000 g).

Супернатант не является стабильным и не может быть оставлен на хранение. Мы рекомендуем взвесить свежее количество образца для нового анализа, если анализ должен быть повторен.

Разбавление образцов

Образцы стула

Супернатант центрифугируется при 13,000 оборотах в минуту в течение 2 мин. и разбавляется 1: 250 в промывочном буфере.

Например:

40 мкл супернатанта + **960 мкл** промывочного буфера, хорошо перемешать (**разведение I**) (**1:25**)

100 мкл этого разведения I + **900 мкл** промывочного буфера, хорошо перемешать (**разведение II**) (**1:10**)

Для анализа пипетировать **100 мкл** супернатанта **шага разбавления II** на лунку.

Образцы сыворотки и плазмы

Свежесобранная кровь должна быть центрифугирована в течение одного часа. Хранить образцы при -20 °C, если они не анализируются в тот же день. Липемичные или гемолитические

образцы могут давать ошибочные результаты. Образцы должны быть хорошо перемешаны перед анализом. Мы рекомендуем дублировать анализы для каждого образца.

Нормальные образцы разбавляют в соотношении **1:40000**.

Образцы, взятые у пациентов с болезнью Крона и др., разводят 1:250000 и 1:1000000. Используйте соответствующий коэффициент разбавления для расчета концентрации α_1 -антитрипсина.

Разбавление 1:40000

Например:

10 мкл сыворотки + **990 мкл** SAMPLEBUF (буфер для образцов), хорошо перемешать (разведение I)

100 мкл разведения I + **990 мкл** SAMPLEBUF (буфер для образцов), хорошо перемешать (разведение II)

25 мкл разведения II + **975 мкл** SAMPLEBUF (буфер для образцов) = 40000

Разбавление 1:250000

Например:

10 мкл сыворотки + **990 мкл** SAMPLEBUF (буфер для образцов), хорошо перемешать (разведение I)

10 мкл разведения I + **990 мкл** SAMPLEBUF (буфер для образцов), хорошо перемешать (разведение II)

20 мкл разведения II + **480 мкл** SAMPLEBUF (буфер для образцов) = 1:250000

Для анализа, пипетировать **100 мкл** супернатанта **заключительного шага разведения** в каждую лунку.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Принцип теста

В анализе используется метод сэндвича с двумя поликлональными антителами, связанными с человеческим α_1 -антитрипсином.

Стандарты, контроли и разведенные образцы, которые анализируются на человеческий α_1 -антитрипсин, добавляют в лунки планшета, покрытого высокоаффинными поликлональными анти-человеческими антителами α_1 -антитрипсина. В течение первого шага инкубации, α_1 -антитрипсин связывается с иммобилизованным антителом. Затем поликлональные антитела анти-человеческого α_1 -антитрипсина, конъюгированного с пероксидазой, добавляются в каждую лунку, и формируется "сэндвич" захвата антитело - человеческий α_1 -антитрипсин - конъюгат пероксидазы. Тетрамилбензидин (TMB) используется в качестве пероксидазного субстрата. В конце добавляется кислый стоп раствор для остановки реакции. Цвет меняется от синего к желтому. Интенсивность желтого окрашивания прямо пропорциональна концентрации α_1 -антитрипсина. Кривая дозы-реакции строится на основании единиц поглощения (оптическая плотность, OD при 450 нм) по сравнению с концентрацией, которая генерируется, используя значения, полученные из стандартного. α_1 -антитрипсин, присутствующий в образцах, определяют непосредственно от этой кривой.

Процедура теста

- Приведите все **реагенты и образцы** к **комнатной температуре (18-26 °C)** и смешайте хорошо
- Отметьте позиции **STD/CTRL/SAMPLE** (Стандарт/Контроль/Образец) в протоколе
- Извлеките микропланшетные полоски** из упаковки. Храните неиспользуемые полоски закрытыми при 2-8 °C. Полоски стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке
- Промойте каждую лунку **5 раз** добавлением **250 мкл разбавленного промывочного буфера** в каждую лунку. После последнего шага промывки удалить остатки буфера
- Внесите **100 мкл STD/CTRL/SAMPLE** (Стандарт/Контроль/Образец) в дублях в соответствующие лунки
- Накрыть панель и инкубировать **при комнатной температуре в течение 1 часа** на горизонтальном миксере
- Удалить содержимое всех лунок. Промойте каждую лунку **5 раз** добавлением **250 мкл разбавленного промывочного буфера** в каждую лунку. После последнего шага промывки удалить остатки буфера
- Добавить **100 мкл CONJ** (конъюгат) в каждую лунку
- Накрыть панель и инкубировать **при комнатной температуре в течение 1 часа** на горизонтальном миксере
- Удалить содержимое всех лунок. Промойте каждую лунку **5 раз** добавлением **250 мкл разбавленного промывочного**

буфера в каждую лунку. После последнего шага промывки удалить остатки буфера
11. Добавить 100 мкл SUB (субстрат) в каждую лунку
12. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10-20 минут в темноте*
13. Добавить 50 мкл STOP (стоп раствор) в каждую лунку, тщательно перемешать
14. Считайте поглощение с ИФА – считывающее устройство при 450 нм против 620 нм (или 690 нм) в качестве контроля. Если контрольная длина волны не доступна, считайте только при 450 нм. Если ослабление наивысшего стандарта выходит за границы диапазона фотометра, поглощение необходимо измерять немедленно при 450 нм против 620 нм в качестве контроля

*Интенсивность изменения окраски чувствительна к температуре. Рекомендуется наблюдение за изменением цвета и остановка реакции при хорошей различимости.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Следующие алгоритмы могут быть использованы альтернативно для вычисления результатов.

Мы рекомендуем использовать "4-Параметровый алгоритм".

1. 4-Параметровый алгоритм

Рекомендуется использовать линейную ось ординат для оптической плотности и логарифмическую ось абсцисс для концентрации. При использовании логарифмической оси абсцисс нулевой калибратор должен быть указан со значением меньше 1 (например, 0.01).

2. Позиционный расчет

Мы рекомендуем линейную ось ординат для оптической плотности и линейную ось абсцисс для концентрации.

3. Слайн-алгоритм

Мы рекомендуем линейную ось ординат для оптической плотности и логарифмическую ось абсцисс для концентрации. При использовании логарифмической оси абсцисс нулевой калибратор должен быть указан со значением, меньшим 1 (например, 0.01).

Степень достоверности полученных пар значений должна проверяться до автоматической оценки результатов. Если эта опция не доступна с используемой программой, контроль парных значений должен быть сделан вручную.

Образцы стула

Чтобы получить концентрацию α_1 -антитрипсина в образцах кала, необходимо использовать соответствующий коэффициент разбавления согласно методу подготовки образца:

Для концентрации α_1 -антитрипсина фекальных образцов, вычисление провести как описано в следующем примере:

вес: 80 мг (1 мл образца = 1 г) = 0,08 мл
шаг разбавления 1: 5 мл/0,08 мл = 62,5
шаг разбавления 2: 250
коэффициент разбавления: 62,5 x 250 = 15625
Умножьте результат на **15625**, чтобы получить реальную концентрацию. Коэффициент разбавления зависит от массы фекалий.

Образцы сыворотки и плазмы

Для расчета α_1 -антитрипсина в образцах **сыворотки** и **плазмы**, результат нужно умножить на **40 000** или **250 000** и **дополнительно на коэффициент 3 для каждого образца.**

Очистка

Используйте следующую формулу для расчета очистки

$$\text{Очистка (мл/сутки)} = V \cdot F / S$$

V = объем фекалий в мл/сутки, среднее значение за 3 дня (1 мл стула = 1 г)

F = средняя концентрация α_1 -антитрипсина фекалий за 3 дня, рассчитанная из стандартной кривой и умноженная на коэффициент разбавления (мкг/л или мг/дл)

S = средняя концентрация α_1 -антитрипсина сыворотки за 3 дня (мг/дл), рассчитанная из стандартной кривой и умноженная на коэффициент разбавления (мкг/л или мг/дл)

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

Образцы кала с концентрацией α_1 -антитрипсина большей, чем самое высокое стандартное значение, должны быть дополнительно разбавлены буфером для промывки и повторно проанализированы.

Образцы сыворотки и плазмы с концентрацией α_1 -антитрипсина большей, чем самое высокое стандартное значение, должны быть дополнительно разбавлены SAMPLEBUF (буфер для образцов) и повторно проанализированы.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольные образцы должны быть проанализированы в каждом запуске. Результаты, полученные от анализа контрольных образцов, должны быть оценены на приемлемость использования соответствующих статистических методов. Результаты образцов пациента могут быть не действительными, если в течение одного и того же анализа одно или больше значений контрольного образца находятся вне допустимых пределов.

Ожидаемые значения

Очистка α_1 -антитрипсина: < 27,5 мл/сутки (n = 76)
Предельное значение для здоровых людей (стул): < 26,8 мг/дл
Концентрации (сыворотки и плазмы): 90 - 180 мг/дл

Эти нормальные диапазоны должны использоваться только в качестве ориентира. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные предполагаемые пределы для данной популяции.

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность и воспроизводимость

Внутрисерийная вариация

Точность (внутрисерийная вариация) Immundiagnostik ИФА теста α_1 -антитрипсина была рассчитана из 20 повторных определений на каждом из двух образцов.

Внутрисерийная CV n = 20

Образец	Среднее значение α_1 -антитрипсина (мг/дл)	Внутрисерийное CV (%)
1	15,2	4,5
2	42,2	13,1

Междусерийная вариация

Общая точность (междусерийной вариации) Immundiagnostik ИФА теста α_1 -антитрипсина была рассчитана по данным 2 образцов, полученных в 20 различных анализах тремя лаборантами в двух различных партиях реагентов в течение трёх месяцев.

Междутестовая точность n = 20

Образец	Среднее значение α_1 -антитрипсина (мг/дл)	Междусерийное CV (%)
1	16,15	9,8
2	54,46	14,8

Восстановление

В два образца были добавлены различные количества калибратора α_1 -антитрипсина и провели измерения.

Восстановление n = 4

Образец (мг/л)	Спайк	Ожидаемые значения α_1 -антитрипсина (мкг/л)	Измеренные значения α_1 -антитрипсина (мкг/л)
6.3	1.65	7.95	7.2
6.3	5	11.3	11.4
6.3	15	21.3	20.9
6.3	45	51.3	46.7
5.6	1.65	7.3	7.0
5.6	5	10.6	10.9
5.6	15	20.6	17.5
5.6	45	50.6	46.7

Чувствительность

Предел чувствительности был установлен как $B_0 + 2 \text{ SD}$. Нулевой стандарт измерялся 20 раз.

n = 20

Образец	Среднее значение α_1 -антитрипсина (OD)	Стандартная вариация	Предел обнаружения (мг/дл)
1	0,117	0,015	1,8

Линейность

Два образца пациента с известной концентрацией α_1 -антитрипсина были серийно разбавлены и измерены. Полученные концентрации

α_1 -антитрипсина были сравнены с ожидаемыми (расчетными) значениями:

n = 2

Образец	Разбавление	Ожидаемые значения (мг/дл)	Измеренные значения (мг/дл)
A	1:12500	48	48.88
	1:25000	24.5	23.25
	1:50000	12.3	11.9
	1:100000	6.1	6
B	1:12500	158.4	158.4
	1:25000	79.3	99
	1:50000	39.6	33
	1:100000	19.8	22.1

Перекрестная реактивность

С другими белками плазмы крови в стуле перекрестная реактивность не наблюдалась.

С α_1 -антитрипсином в сыворотке мышей перекрестная реактивность не наблюдалась.

12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики In Vitro.
- Руководящие принципы контроля качества должны быть соблюдены.
- Человеческий материал, используемый в наборе, был проверен и признан отрицательным на ВИЧ, гепатит В и гепатит С. Однако, в целях безопасности, все компоненты набора должны рассматриваться как потенциально инфицированные.
- Реагенты, входящие в набор, содержат азид натрия или тимеросал в качестве бактерицидов. Азид натрия и тимеросал являются токсичными. Субстраты для ферментативных реакций являются токсичными и канцерогенными. Избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Стоп раствор состоит из серной кислоты, которая является сильной кислотой. Даже с разбавленной, с ней, по-прежнему, необходимо обращаться с осторожностью. Она может вызвать химические ожоги и работать с ней необходимо в перчатках, защитных очках, а также соответствующей защитной одежде. Любой разлив должен быть устранен немедленно с большим количеством воды.

13. ТЕХНИЧЕСКИЕ СОВЕТЫ

- Не смешивайте компоненты из разных наборов и партий.
- Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Раствор субстрата должен оставаться бесцветным до использования.
- Для обеспечения точности результатов необходимо плотное герметичное соединение пластин во время инкубации.
- Избегайте вспенивания при смешивании реагентов.
- Анализ всегда должен быть выполнен в соответствии с прилагаемым руководством.

14. ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ТЕСТИРОВАНИЯ

- Данный анализ был подготовлен и распространен в соответствии с руководящими принципами IVD 98/79/ЕС.
- Все реагенты в комплекте набора предназначены только для использования в In-Vitro диагностике.
- Руководящие принципы для медицинских лабораторий должны быть соблюдены.
- Время инкубации, температура инкубации и объемы пипетирования компонентов определяются производителем. Любое изменение процедуры теста, не согласованное с производителем, может повлиять на результаты теста. Immundiagnostik AG в таком случае не несет ответственности за любой ущерб в результате не правильного использования.
- Претензии и жалобы в отношении недостатков должны быть предъявлены в течение 14 дней после получения товара. Продукт должен быть отправлен компании Immundiagnostik AG наряду с письменной жалобой.

15. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: www.diameb.ua

www.biotechlab-s.com.ua