

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІЗОЦИМУ В ЗРАЗКАХ СИРОВАТКИ, СЕЧІ, СПИННОМОЗКОВОЇ РІДИНИ

K 6902, Lysozyme ELISA

Каталог. №: K 6902

Методика від 06-08-2014

Кількість : 96

Виробник : Immundiagnostik AG
(Німеччина)



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

Для діагностичного використання в in-vitro діагностиці

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір призначений для кількісного визначення лізоциму в зразках сироватки, сечі, спинномозкової рідини. Тільки для діагностики in vitro.

2. КОРОТКИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ

Лізоцим (мурамідаза) являє собою білок з молекулярною масою близько 15 кДа і належить до групи лужних глюкозидаз. Лізоцим виробляється гранулоцитами, моноцитами і макрофагами. Основним джерелом фекального лізоциму є кишкові гранулоцити. Лізоцим може бути виявлений у всіх клітинах запального інфільтрату при гострому нападі хвороби Крона. В деякій мірі, лізоцим також активно секретується мононуклеарними клітинами в просвіті кишечника.

Показання

- Діагностика та моніторинг хвороби Крона
- Рання діагностика реакції відторгнення у разі трансплантації нирок
- Диференціальна діагностика і моніторинг лейкозу
- Діагностика, лікування та моніторинг інфекцій сечовивідних шляхів у дітей
- Диференціальна діагностика вірусного і бактеріального менінгіту у дітей

3. МАТЕРІАЛИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

Кат. №	Етикетка	Компоненти набору	Кількість
K 6902MTP	PLATE	Один тримач з попередньо покритими смужками	12 x 8 лунок
K 6902WB	WASHBUF	Промивний концентрат 10x	2 x 100 мл
K 6902VP	CONJBUF	Буфер для розведення кон'югату	1 x 15 мл
K 6902K	CONJ	Концентрат кон'югату (антитіла кролика до лізоциму, кон'юговані з пероксидазою)	1 x 50 мкл
K 6902ST	STD	Стандарти, готові до використання (0; 1.1; 3.3; 10; 30 нг/мл)	5 x 1 мл
K 6902KO1	CTRL	Контроль, готовий до використання	1 x 1 мл
K 6902KO2	CTRL	Контроль, готовий до використання	1 x 1 мл
K 6902TMB	SUB	TMB субстрат, готовий до використання	1 x 15 мл
K 6902AC	STOP	Стоп розчин, готовий до використання	1 x 15 мл

4. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАВЛЯЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Вода високого ступеня очищення*
- Ваги лабораторні
- Калібровані піпетки змінного об'єму на 10-1000 мкл і одноразові змінні наконечники до них
- Плівки для заклеювання лунок мікропланшета
- Горизонтальний мікропланшетний шейкер
- Багатоканальна піпетка або автоматичний диспенсер
- Центрифуга для центрифугування при 3000 g
- Вортекс
- Лабораторні скляні або пластикові циліндри, склянки тощо
- Мікропланшетний рідер (необхідні фільтри див. розділ 7)

*Immundiagnostik AG рекомендує використовувати воду високого ступеня очищення (Тип води 1; ISO 3696), яка вільна від нерозчинних і колоїдних іонів і органічних молекул (вільна від частинок > 0.2 мкм), електропровідність 0.055 мкс/см при 25 °C (≤ 18.2 MΩ см).

5. ПІДГОТОВКА І ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ

- Щоб провести тест кілька разів, переконайтеся, що реагенти зберігаються в умовах, зазначених на етикетці. **Підготуйте тільки відповідну кількість, необхідну для кожного аналізу.** Набір може використовуватися до 4 разів до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Реагенти з об'ємом менше 100 мкл слід центрифугувати перед використанням, щоб уникнути втрати об'єму.
- **Концентрат промивного буфера ELISA (WASHBUF)** слід розбавити водою високого ступеню очищення 1:10 перед використанням (100 мл WASHBUF + 900 мл ультра чистої води), ретельно перемішати. Кристали можуть бути присутніми через високу концентрації солі в основних розчинах. Кристали повинні бути розчинені при 37 °C за допомогою водяної бані перед розведенням. **Концентрат буфера стабільний при 2-8 °C до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. Розведений буферний розчин можна зберігати в закритій колбі при температурі 2-8 °C протягом одного місяця.**
- **Концентрат кон'югату (CONJ)** повинен бути розведений 1:1000 в буфері для розведення (100 мкл CONJ + 10 мл CONJBUF). Концентрат залишається стабільним при 2-8 °C до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. **Розведений кон'югат не є стабільним і не може бути залишений на зберігання.**
- Всі інші реагенти готові до використання. Тестові реагенти стабільні до закінчення терміну придатності (див. Етикетку тестового пакета) при температурі 2-8 °C.

6. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Сироватка

Сироватку необхідно центрифугувати протягом однієї години після збору. **Зберігайте зразки при -20 °C**, якщо вони не аналізуються в той же день. Ліпемічні або гемолітичні зразки можуть дати неправдиві результати. Зразки повинні бути перемішані добре перед аналізом. Зразки розводять в діапазоні від 1:500 до 1:1000 промивним буфером. Використовуйте цей фактор розбавлення для розрахунку концентрації лізоциму.

Сеча

Ми рекомендуємо розведення 1:5 промивним буфером перед аналізом для зразків сечі.

Рідина

Ми рекомендуємо розбавлення 1:50 промивним буфером перед аналізом для зразків рідини.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Принцип тесту

В аналізі використовується метод сендвіча з двома поліклональними антитілами, які розпізнають лізоцим людини.

Стандарти, контролю і розведені зразки, які аналізуються на лізоцим людини, додають в лунки планшета, покритого високо афінними поліклональними анти-людськими антитілами лізоциму. Протягом першого кроку інкубації, лізоцим зв'язується з іммобілізованим антитілом. Потім антитіла анти-людського лізоциму, кон'югованого з пероксидазою, додаються в кожен лунку, і формується "сендвіч" захоплення антитіло-людський лізоцим-кон'югат пероксидази. Тетраметилбензидин (ТМБ) використовується як субстрат пероксидази. У кінці додається кислотний стоп розчин для зупинки реакції. Колір змінюється від синього до жовтого. Інтенсивність жовтого забарвлення прямо пропорційна концентрації лізоциму. Крива дози реакції будується на підставі одиниць поглинання (оптична щільність, OD при 450 нм) порівняно з концентрацією, яка генерується, використовуючи значення, отримані зі стандартних. Лізоцим, присутній у зразках, визначають безпосередньо з цієї кривої.

Процедура тесту

Дайте нагрітиса всім реагентам і зразкам до кімнатної температури (15-30 °C) і добре перемішайте. Відберіть з набору необхідну для проведення аналізу кількість стрипів. Зберігайте невикористані стрипи закритими при 2-8 °C. Стрипи стабільні протягом всього терміну придатності, зазначеного на етикетці набору. Рекомендовано аналіз проводити в дубляж.

1.	Позначити позиції STD/CTRL/SAMPLE (Стандарт/Контроль/Зразок) в протоколі
2.	Промити кожну лунку 5 раз додаванням 250 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку. Після останнього кроку промивання видалити залишки буфера
3.	Внести 100 мкл STD/CTRL/SAMPLE (Стандарт/Контроль/Зразок) у відповідні лунки
4.	Накрити планшет і інкубувати при кімнатній температурі (15-30 °C) протягом 1 години на горизонтальному міксері
5.	Видалити вміст всіх лунок. Промити кожну лунку 5 раз додаванням 250 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку. Після останнього кроку промивання видалити залишки буфера
6.	Додати 100 мкл розведеного CONJ (кон'югат) у кожну лунку
7.	Накрити панель і інкубувати при кімнатній температурі (15-30 °C) протягом 1 години на горизонтальному міксері
8.	Видалити вміст всіх лунок. Промити кожну лунку 5 раз додаванням 250 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку. Після останнього кроку промивання видалити залишки буфера
9.	Додати 100 мкл SUB (субстрат) у кожну лунку
10.	Інкубувати при кімнатній температурі (15-30 °C) протягом 10-20 хвилин в темряві*
11.	Додати 100 мкл STOP (стоп розчин) в кожну лунку, ретельно перемішати
12.	Зчитати поглинання негайно з ІФА рідером при 450 нм проти 620 нм (або 690 нм) в якості контролю. Якщо контрольна довжина хвилі не доступна, зчитайте тільки при 450 нм . Якщо ослаблення найвищого стандарту виходить за межі діапазону фотометра, поглинання необхідно вимірювати негайно при 405 нм проти 620 нм в якості контролю

* Інтенсивність зміни забарвлення чутлива до температури. Рекомендується спостереження за зміною кольору і зупинка реакції при чіткій відмінності кольорів.

8. РЕЗУЛЬТАТИ

Наступні алгоритми можуть бути використані альтернативно для обчислення результатів. Ми рекомендуємо використовувати "4-параметровий алгоритм".

1. 4-параметровий алгоритм

Рекомендується використовувати лінійну вісь ординат для оптичної щільності і логарифмічну вісь абсцис для концентрації. При використанні логарифмічної осі абсцис нульовий калібратор повинен бути вказаний зі значенням менше 1 (наприклад, 0.001).

2. Позиційний розрахунок

Ми рекомендуємо лінійну вісь ординат для оптичної щільності і лінійну вісь абсцис для концентрації.

3. Сплайн-алгоритм

Ми рекомендуємо лінійну вісь ординат для оптичної щільності і логарифмічну вісь абсцис для концентрації.

Ступінь достовірності отриманих пар значень повинна перевірятися до автоматичної оцінки результатів. Якщо ця опція не доступна з використовуваною програмою, контроль парних значень повинен бути зроблений вручну.

Сироватка

Для отримання значень концентрації лізоциму в зразках сироватки, помножьте отримане значення на фактор розведення у відповідності з процедурою підготовки зразків.

Сеча

Отримане значення помножьте на фактор розведення 5.

Спинномозкова рідина

Отримане значення помножьте на фактор розведення 50. При використанні іншого розведення зразків для отримання реальних значень концентрації, помножьте отримані результати на відповідний фактор розведення.

9. ОБМЕЖЕННЯ

Зразки, в яких концентрація лізоциму вище значень в діапазоні вимірювання, необхідно розвести ще і повторно протестувати. Зразки з концентрацією нижче діапазону вимірювання не можуть бути точно оцінені.

Верхня межа діапазону вимірювань може бути розрахована як:

Найвища концентрація по калібрувальній кривій X використовуваній коефіцієнт розведення зразка

Нижня межа діапазону вимірювань може бути розрахована як:

Межа виявлення X використовуваній коефіцієнт розведення зразка

10. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендовано, по можливості, використовувати зовнішні контролю для проведення внутрішнього контролю якості.

Контрольні зразки повинні аналізуватися при кожній постановці. Достовірність результатів, отриманих при аналізі контрольних зразків, необхідно оцінювати відповідними статистичними методами. Якщо в ході аналізу для одного або декількох контрольних зразків були отримані значення, які не потрапляють у встановлений діапазон допустимих значень, то результати, отримані для тестованих зразків, можуть бути недостовірними.

Референсні значення

Сироватка*

700 - 2580 нг/мл

Концентрація лізоциму залежить від його синтезу моноцитами, макрофагами, гранулоцитами, а також клітинами паренхіми нирок.

Рівень лізоциму підвищений при мієломоноцитарному лейкозі, саркоїдозі. Рівень лізоциму знижений при сепсисі новонароджених, панмієлопатії.

Сеча*

1,7 - 123 нг/мл

Рівень лізоциму в сечі підвищений при мієломоноцитарній лейкемії, інфекції сечового тракту у дітей.

Рівень лізоциму в сечі знижений при панмієлопатії.

Спинномозкова рідина*

< 62 нг/мл

* Лабораторія Dr. Limbach, Heidelberg, <http://www.labor-limbach.de>

Рекомендовано в кожній лабораторії встановлювати власні діапазони нормальних значень.

11. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналітична чутливість

Нульовий стандарт було аналізовано 21 раз. Ліміт детекції встановлений як $B_0 + 1.645 * SD$, його значення склало 0.144 нг/мл.

Точність і відтворюваність

Усередині серії (n = 26)

Зразок	Лізоцим, нг/мл	CV, %
A	658.4	2.2
B	397.9	2.8

Між серіями (n = 18)

Зразок	Лізоцим, нг/мл	CV, %
A	696.5	4.6
B	391.4	6.4

Відновлення

У два зразки були додані різні кількості калібратора лізоциму і проведено вимірювання (n=2).

Зразок	Ненасичений, нг/мл	Насичений, нг/мл	Очікуване значення, нг/мл	Отримане значення, нг/мл
A	0.46	1.8	2.26	2.17
		2.7	3.16	3.21
		5.0	5.46	5.51
B	0.74	1.8	2.54	2.48
		2.7	3.44	3.50
		3.7	4.44	4.65

Відновлення при розведенні

Зразок пацієнта було розведено і проаналізовано. Результати наведені нижче (n=1).

Зразок	Розведення	Очікуване значення, нг/мл	Отримане значення, нг/мл
A	1:500	626.3	626.3
	1:1000	313.2	324.2
	1:2000	156.6	173.0

Специфічність

З іншими протейнами плазми перехресної реактивності не спостерігалось.

12. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Всі реагенти даного набору призначені тільки для in vitro діагностики.
- Матеріали людського походження, що входять до складу набору, були протестовані на наявність ВІЛ та вірусу гепатиту В, був отриманий негативний результат. Тим не менш, з міркувань безпеки, всі компоненти набору повинні розглядатися як потенційно інфекційно небезпечні.

- Реагенти в якості бактерицидних добавок містять азид натрію або тімеросал. Азид натрію і тімеросал є токсичними сполуками. Субстрат для ферментної кольорової реакції є токсичним і канцерогенним. Уникайте потрапляння на шкіру або слизові оболонки.
- Стоп розчин містить сірчану кислоту, яка є сильною кислотою. Навіть у розведеному вигляді, з нею необхідно звертатися з великою обережністю. Реагент може викликати хімічні опіки, з ним необхідно працювати в захисних рукавичках, з використанням захисних окулярів для очей і відповідного захисного одягу. При розливі реагенту його необхідно негайно видалити великою кількістю води.

13. ТЕХНІЧНІ ЗАУВАЖЕННЯ

- Не замінійте або не змішуйте окремі компоненти з різних лотів. Не рекомендується використовувати для серії аналізів стрипи з різних мікропланшетів, навіть якщо вони одного лота так як відкриті і запечатані стрипи зберігалися в різних умовах.
- При проведенні кожної серії аналізів необхідно тестувати контролі.
- Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності, який вказаний на етикетці набору.
- Розчин субстрату перед використанням повинен бути безбарвним.
- Для отримання точних результатів, під час інкубації використовуйте плівку для заклеювання мікропланшетів.
- При піпетуванні реагентів уникайте утворення піни.
- Не міняйте кришки флаконів різних реагентів.
- Виконуйте аналіз згідно актуальної версії інструкції, що поставляється з набором.

14. ЗАГАЛЬНІ ВКАЗІВКИ ПО ПРОЦЕДУРІ ТЕСТУВАННЯ

- Даний аналіз був підготовлений і розповсюджений у відповідності з керівними принципами IVD 98/79/ЕС.
- Необхідно дотримуватися рекомендацій з проведення контролю якості.
- Час інкубації, температура інкубації і об'єми, які піпетуються, для різних компонентів встановлені виробником. Будь-які відхилення від процедури аналізу, описаної в даній інструкції, не узгоджені з виробником, можуть вплинути на результати тестування. Виробник не несе відповідальності за будь-які збитки, заподіяні в разі неправильного використання набору.
- Претензії та скарги щодо недоліків повинні бути пред'явлені протягом 14 днів після отримання товару. Продукт повинен бути відправлений компанії Immundiagnostik AG разом з письмовою скаргою.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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