

sICAM-1 високочутливий ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення розчинної ICAM-1 в сироватці людини, плазмі (EDTA, цитрат, гепарин), супернатанті культури клітин, амніотичній рідині, спонтанній сечі і жовчі



REF **BE 59001**



96



2-8°C

Тільки для дослідницьких цілей.



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,
тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

ЗМІСТ

1. Призначення
2. Загальна інформація
3. Принцип аналізу
4. Надані реагенти
5. Інструкція зі зберігання набору ІФА
6. Інструкції з збору та зберігання зразків
7. Матеріали, необхідні, але не надані
8. Запобіжні заходи щодо використання
9. Підготовка реагентів
10. Протокол аналізу
11. Розрахунок результатів
12. Обмеження
13. Характеристика виконання
14. Інформація про замовлення
15. Підсумок підготовки реагентів
16. Підсумок протоколу випробувань

1. Призначення

ІФА (ICAM-1) людини (високочутливий) є імуноферментним аналізом для кількісного визначення ICAM-1 людини.

ІФА ICAM-1 людини (високочутливий) використовується тільки для досліджень.

Не для діагностичних або терапевтичних процедур.

2. Загальна інформація

Молекула міжклітинної адгезії-1 (ICAM-1) є членом імуноглобулінового супергенного сімейства і функціонує як ліганд для Антигену-1 (LFA-1), пов'язаний з функцією лімфоцитів, альфа - бетакомплексом, що є членом сімейства лейкоцитарного інтегрину клітинної клітини і клітинно-матричних рецепторів. Ця сім'я складається з лейкоцитарної адгезії глікопротеїни LFA-1, які опосередковують адгезію лімфоцитів, Mac-1, який опосередковує адгезію гранулоцитів і p150,95. ICAM-1 являє собою одноцепочечний глікопротеїн з поліпептидним ядром 55 кД, який може бути виражений на не-гематопоетичних клітинах багатьох ліній, таких як судинні ендотеліальні клітини, тимусні епітеліальні клітини, інші епітеліальні клітини і фібробласти і на гемопоетичних клітинах, таких як тканини макрофаги, стимульовані митогеном Т- лімфобласти, зародковий центр В-клітин і дендритні клітини в мигдалинах, лімфатичних вузлах і Пейєрових пластирах.

ICAM-1 індукується на фібробластах і ендотеліальних клітинах шляхом запальних медіаторів, таких як IL-1, TNF і IFN гамма протягом декількох годин і корелює з інфільтрацією лімфоцитів у запальних ураженнях.

ICAM-1, здається, є початковим маркером запальних реакцій і виражений раніше і в більшій мірі, ніж це HLA-DR.

Роль ICAM-1 як маркера захворювання була продемонстрована для кількості різних показань і патологічних ситуацій.

ICAM-1 підвищує регуляцію при запаленні алергічних дихальних шляхів, рекрутированії активованих лейкоцитів і патогенезі алергічних ринітів.

При алергічному контактному дерматиті індукували ICAM-1 на кератиноцитах вже через 4 години після застосування алергічного тесту.

При раку сечового міхура існує пряма залежність між конститутивною експресією ICAM-1 і гістопатологічною оцінкою пухлини. Сироватки пацієнтів з ГІ- раком з метастазами в печінці виявилися з значно вищими рівнями ICAM-1, ніж у пацієнтів без метастазування.

ICAM-1 експресується на злоякісних клітинах мієлоїдних, а також В-клітинах лімфоїдних рельєфів. При лімфопроліферативних розладах ICAM-1 пов'язаний зі ступенем злоякісності. У HTLV-1 асоційованій мієлопатії, і дорослому Т-клітинному лейкозі ICAM-1 в сироватці крові підвищений. Пацієнти зі злоякісними меланомами мають значно підвищений сироваткової ICAM-1, що має прогностичне значення. Значно підвищені концентрації ICAM-1 виявляються у ВІЛ-1 інфікованих осіб.

При тропічній малярії ICAM-1 служить при адгезії інфікованих еритроцитів до ендотелію капіляра, проява яких важливо в патогенезі церебральної малярії.

ICAM-1 є хорошим прогностичним параметром реагування на гепатит В-інфекції до бета-терапії ІФН.

Схоже, ICAM-1 забезпечує механізм, який є вирішальним для відторгнення алотрансплантата рогівки.

Експресія ICAM-1 також збільшується під час відторгнення ендотелію капілярів, мембрани міокарда і ендокарду пересаженого серця.

Сироваткові рівні ICAM-1 значно підвищувалися при гострому відторгненні ниркового трансплантату. Вимірювання ICAM-1 корисно для дискримінації відторгнення циклоспорину-А інтоксикації трансплантованої нирки.

Сильна експресія ICAM-1 також спостерігається у пацієнтів з гострим відторгненням у порівнянні зі стабільними трансплантатами печінки або пацієнтами з ускладненнями без відторгнення.

Сироваткові рівні циркулюючих ICAM-1 і L- селектину були виявлені підвищеними при інсулінозалежному цукровому діабеті (IDDM) і у суб'єктів ризику IDDM.

Значне підвищення сироваткової ICAM-1 було продемонстровано при передньому увеїті при проміжному увеїті і у пацієнтів з саркоїдозом.

У перші 12-24 години спостерігається гострий інфаркт міокарда, зменшення ICAM-1 можна виміряти. Це може забезпечити прогностичне значення ICAM-1 також для ішемії міокарда і реперфузії. Підвищена клубочкова експресія ICAM-1 спостерігається в ранніх випадках різних форм гломерулонефриту і експресія каналця de novo ICAM-1 показує сильну кореляцію з активністю хвороби.

При астмі ICAM-1 регулюється на запаленому епітелії дихальних шляхів і бронхіальному ендотелію, тим самим опосередковуючи еозинофілну адгезію. ICAM-1 достовірно підвищений у сироватках хворих з ідіопатичним фіброзом легенів або саркоїдозом.

ICAM-1 є надійним маркером запального процесу в межах центральної нервової системи, яка пов'язана з кров'ю: бар'єр спинно-мозкової рідини пошкоджений.

Розчинна ICAM-1 не виявляється в більшості середньотемпературних навколоплідних вод зразках, але коли вони присутні, істотно пов'язані з внутрішньоутробним зростанням уповільнення і підвищені середньо триместрові рівні материнської сироватки альфа фетопротейну.

Збільшені рівні ICAM-1 корелюють з активністю ревматоїдного артрити.

У псоріазі ICAM-1 на кератиноцитах спостерігається сильна кореляція з тяжкістю захворювання і знижується при успішній терапії. Перед лікуванням рівні ICAM-1 значно підвищені порівняно зі здоровими контролями.

3. Принцип аналізу.

Анти - людський ICAM-1 покриття антитілами абсорбується на мікролунки.

Малюнок 1 (див. оригінал інструкції)

ICAM-1 людини присутній у зразку або стандарті зв'язується з антитілами, адсорбованими до мікролунки. HRP-кон'юговане анти-людське антитіло ICAM-1 додається і зв'язується з людським ICAM-1 захоплюється першим антитілом.

Малюнок 2 (див. оригінал інструкції)

Після інкубації незв'язаний HRP кон'югований анти-людський ICAM-1 видаляють під час етапу промивання і розчин субстрату реакційного з HRP додають в лунки.

Малюнок 3

Кольоровий продукт формується пропорційно кількості ICAM-1 людини, присутнього в зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти і абсорбцію вимірюють при 450 нм. стандартну криву готують з 5 людських стандартних розведень ICAM-1 і концентрацію ICAM-1 людини визначають.

Малюнок 4



4. Реагенти надані

MTP 1 алюмінієвий пакет з мікропланшетом, покритим моноклональними антитілами до людського ICAM1

HRP-Conjugate 1 флакон (200 мкл) HRP-кон'югату анти-людського ICAM-1 моноклональне антитіло

Standard 2 ампули (500 мкл) ICAM-1 людини стандарту, 10 нг / м

SAMPLEDIL 1 флакон (50 мл) розчинник зразка

ASSAYBUF CONC 1 флакон (5 мл) буфера для аналізу концентрат 20х (PBS з 1% Твін 20, 10% БСА)

WASHBUF 1 флакон (50 мл) концентрат промивного буфера 20х (PBS з 1% Твін 20)

SUBS 1 флакон (15 мл) Розчин субстрату (тетраметилбензидин)

STOP1 флакон (15 мл) стоп розчин (1 М фосфорна кислота)

2 Клейові плівки

5. Інструкція зі зберігання набору ІФА.

Зберігати реагенти набору при температурі від 2 ° до 8 ° С. Відразу після використання залишкові реагенти повинні бути повернені до холодного зберігання (від 2 ° до 8 ° С) . Термін експлуатації комплексу та реагентів вказаний на етикетках. Термін експлуатації компонентів набору може бути гарантованим тільки в тому випадку, якщо компоненти зберігаються належним чином, і якщо в разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднюється першим використанням.

6. Інструкції зі збору та зберігання зразків.

Супернатант культури клітин, сироватки і плазми (ЕДТА, цитрат, гепарин) , амніотична рідина, спонтанна сеча і жовч були протестовані за допомогою цього аналізу. Інші біологічні зразки можуть бути придатними для використання в аналізі. Видаліть сироватку або плазму з згустків або клітин так швидко, як це можливо після згортання та сепарації. Зразки, що містять видимий осад, повинні бути очищені перед використанням в аналізі. Не використовуйте грубо гемолізовані або ліпемічні зразки. Зразки слід розділити, і вони повинні зберігатись замороженими при температурі -20 ° С, щоб уникнути втрати біологічно активного людського ICAM-1. Якщо зразки будуть прогнані протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2 ° до 8 ° С (стабільність зразка див. 13.5). Уникайте повторних циклів заморожування-розмороження. Перед аналізом заморожені зразки повинні бути повільно приведені до кімнатної температури та обережно змішані.

Середовища для культивування клітин без сироватки не придатні для визначення ICAM-1 людини за допомогою ІФА.

7. Матеріали необхідні, але не надані.

- 5 мл і 10 мл градуйовані піпетки
- 5 мкл до 1000 мкл регульовані одноканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- 50 мкл до 300 мкл регульовані багатоканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар мікропіпеток
- Склянки, колби, циліндри, необхідні для підготовки реагентів
- пристрій для доставки розчину для промивки (багатоканальна промивна пляшка або автоматична система промивки)
- рідер мікропланшетів здатний до читання на 450 нм (620 нм як необов'язкова еталонна довжина хвилі)
- дистильована в склі або дейонізована вода
- статистичний калькулятор з програмою виконання регресійного аналізу.

8. Запобіжні заходи щодо використання.

Всі реагенти слід вважати потенційно небезпечними. Тому рекомендуємо використовувати цей продукт тільки тим особам, які пройшли навчання в лабораторних умовах та використовують відповідно до принципів належної лабораторної практики. Використовуйте захисний одяг, наприклад лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Необхідно дбати про те, щоб уникнути контакту зі шкірою або з очима. У разі контакту з шкірою або очима промийте негайно водою.

- реагенти призначені тільки для дослідницьких цілей і не призначені для використання в терапевтичних процедурах.
- Не змішуйте та не замінюйте реагенти на ті, що містяться в інших партіях чи інших джерелах.
- Не використовуйте реагенти наборів після закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці.
- Не піддавайте реактиви комплектів сильному освітленню під час зберігання або інкубації.
- Не піпетувати ротовою порожниною.
- Не їжте і не паліть в місцях, де використовуються реагенти або зразки.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами набору або зразками.
- Резинові або одноразові латексні рукавички повинні носитись під час роботи з реагентами набору або зразками.
- Уникати контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте бризок або утворення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного забруднення чи перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть призвести до недійсності випробувань, застосовувати одноразові наконечники піпетки та / або піпетки.
- Використовувати чисті спеціальні лотки для реагентів для дозування кон'югату та реагенту субстрату.
- Вплив на кислоту інактивує кон'югат.
- дистильована в склі вода або дейонізована вода повинна використовуватись для підготовки реагенту.
- Розчин субстрату повинен бути доведений до кімнатної температури перед використанням.
- Знезаражувати і знешкоджувати зразки всі потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Переважним способом знезараження є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121,5 ° C.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти та нейтралізовані відходи, можуть бути змішані з гіпохлоритом натрію в об'ємах таким чином, щоб остання суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Дозвольте 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоту, повинні бути нейтралізовані при додаванні гіпохлориту натрію.

9. Підготовка реагентів

Концентрат буфера повинен бути доведений до кімнатної температури і повинен бути розбавлений перед початком процедури випробувань. Якщо кристали утворюються в буферних концентратах, нагрівайте їх поступово до тих пір, поки вони повністю не розчиняться.

9.1.Промивний буфер (1x)

Залити весь вміст (50 мл) промивного буферу концентрату (20x) у чистий 1000-мл градуований циліндр. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл з дистильованою в склі або деіонізованою водою. М'яко змішайте, щоб уникнути спінювання.

Перемістіть до чистої промивної пляшки та зберігайте при температурі від 2 до 25 ° C. Будь-ласка, зверніть увагу, що промивний буфер (1x) стабільний протягом 30 днів.

Промивний буфер (1x) також може бути приготовлений у відповідності з наведеною нижче таблицею:

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (20x) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

9.2. Буфер аналізу (1х)

Залити весь вміст (5 мл) концентрованого буферу для аналізу (20х) у чистий 100-мл градуйований циліндр. Довести до кінцевого об'єму 100 мл з дистильованою водою. Обережно змішайте, щоб уникнути піноутворення. Зберігайте при температурі від 2 ° до 8 ° С. Будь-ласка, зверніть увагу, що буфер для аналізу (1х) стабільний протягом 30 днів. Буфер аналізу (1х) також може бути приготований, якщо необхідно, згідно з наведеною нижче таблицею:

Кількість стріпів	Буфер аналізу концентрат (20х) мл	Дистильована вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3. HRP-кон'югат

Пам'ятайте, що HRP-кон'югат повинен використовуватися протягом 30 хвилин після розбавлення. Зробіть 1:60 розчин концентрованого HRP-кон'югованого розчину з буфером аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці як необхідно відповідно до наведеної таблиці:

Кількість стріпів	HRP - кон'югат мл	Буфер аналізу (1х) (мл)
1-6	0,05	2.95
1-12	0,10	5.90

9.4. Стандарт ICAM-1 людини

Стандартні розведення можна одержувати безпосередньо на пластині мікропланшету (див. 10d) або, як альтернатива, у пробірках (див. 9.4.1) .

9.4.1. Зовнішнє стандартне розведення.

Позначте 4 пробірки, по одній для кожної стандартної точки.

S2, S3, S4, S5

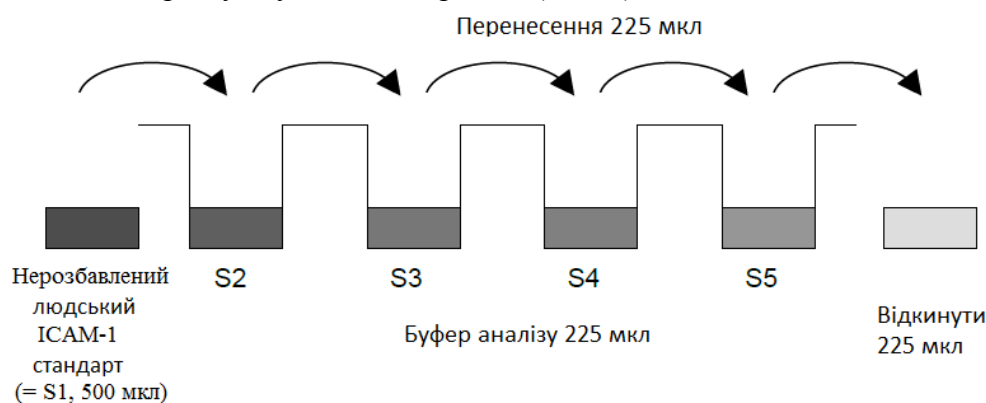
Потім готуйте 1;2 серійні розведення для стандартної кривої наступним чином:

Прокапати 225 мкл розчинника зразка у пробірки S2-S5.

Прокапати 225 мкл нерозбавленого стандарту (служить найвищим стандартом S1, концентрація стандарту 1 = 10 нг / мл у першу пробірку, позначену S2, і змішати (концентрація стандарту 2 = 5 нг / мл).

Прокапати 225 мкл цього розчину у другу пробірку, позначену S3, та змішайте ретельно перед наступним перенесенням. Повторно повторюйте серійні розведення ще 2 рази, створюючи таким чином точки стандартної кривої (див. Мал. 5).

Розчинник зразку служить як порожня (бланк).



Малюнок 5 (див. оригінал інструкції)

10. Протокол аналізу

А) Перед тим, як розпочати процедуру тестування, попередньо розведіть зразки. Розбавити зразки сироватки та плазми 1: 100 з розріджувачем зразка згідно з такою схемою:

Розведення 1: 10 мкл зразка + 90 мкл розріджувача зразка

Розведення 2: 50 мкл розведення 1 + 450 мкл Розчинника зразка

Спонтанні зразки сечі застосовуються нерозбавленими.

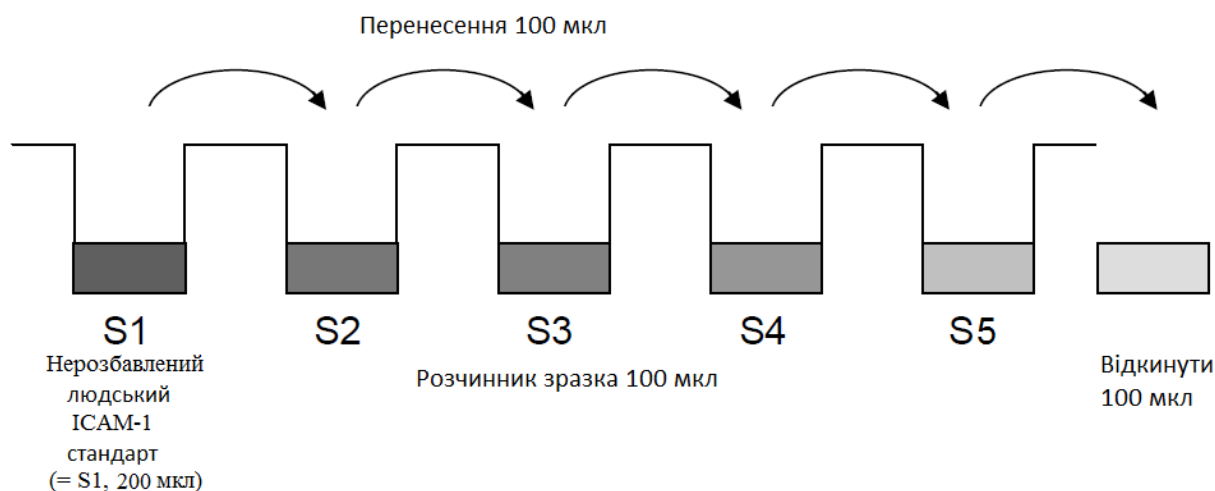
б) визначити кількість стріпів мікропланшета необхідних для тестування потрібної кількості зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для аналізу порожніх (бланк) лунок і стандартів. Кожен зразок, стандарт, порожня лунка (бланк) та необов'язковий контрольний зразок повинні бути проаналізовані в дублікатах. Видаліть стріп мікропланшета із тримача та зберігайте у щільно запечатаному пакеті з фольги з осушувачем при температурі $2^{\circ} - 8^{\circ} \text{C}$ ретельно закритим.

с) Промивайте стріпи мікропланшета двічі з приблизно 400мкл промивного буфера на кожну лунку з повною аспірацією мікрохвильового вмісту між промиваннями. Додайте промивний буфер для знаходження в лунках приблизно 10 - 15 секунд перед аспірацією. Будьте обережні, не подрятати поверхню мікропланшета.

Після останнього етапу промивки, опорожнити лунки та постукати стріпами мікропланшета на абсорбуючу подушку або паперовий рушник для видалення надлишкового промивного буфера. Використовуйте стріпи мікропланшета відразу після миття. Крім того, стріпи мікропланшета можуть бути розміщені догори дном на вологому абсорбентному папері протягом не більше 15 хвилин. **Не дозволяйте лункам висихати.**

д) **Стандартне розведення на мікропланшеті** (Альтернативно, стандартне розведення може бути отримане в пробірках - див. 9.4.1). Додати 100 мкл розчинника зразка у двох примірниках до лунок стандартів B1/2-E1/2, лишаючи A1/2 порожньою. Прокапати 200мкл нерозбавленого стандарту (концентрація = 10,0 нг / мл) у дублікатах у лунки A1 та A2 (див. Табл. 1). Перенесіть 100 мкл у лунки B1 та B2. Змішати вміст лунок B1 і B2 шляхом повторної аспірації і видалення, і перенести 100 мкл до лунок C1 і C2 відповідно (див. мал.6). Будьте обережні, щоб не подрятати внутрішню поверхню мікро лунок. Продовжуйте цю процедуру 2 рази, створюючи два ряди людського стандарту ICAM-1 розведень в межах від 10,00 до 0,63 нг / мл. Видаляють 100 мкл вміст з останніх використовуваних мікролунок (E1, E2).

Малюнок 6



У разі **зовнішнього стандартного розведення** (див. 9.4.1) прокапати 100 мкл цих стандартних розчинів (S1 – S5) в стандартні лунки згідно табл.1.

Таблиця 1 Таблиця, що зображує приклад розташування лунок бланк, стандартів та зразків у стріпах мікропланшета:

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (10,00 нг/мл)	Стандарт 1 (10,00 нг/мл)	Зразок 3	Зразок3
B	Стандарт 2 (5,00 нг/мл)	Стандарт 2 (5,00 нг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
C	Стандарт 3 (2,50 нг/мл)	Стандарт 3 (2,50 нг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
D	Стандарт 4 (1,25 нг/мл)	Стандарт 4 (1,25 нг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
E	Стандарт 5 (0,63 нг/мл)	Стандарт 5 (0,63 нг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
F	(бланк)	(бланк)	Зразок 8	Зразок 8
G	Зразок 1	Зразок1	Зразок 9	Зразок 9
H	Зразок 2	Зразок 2	Зразок 10	Зразок 10

- е). Додайте 100 мкл розчинника зразка у двох примірниках до лунок бланк.
 ф) Додайте 100 мкл кожного 1:100 попередньо розведеного зразка в дублікатах до лунок зразка.
 г) приготуйте HRP-кон'югат (див. підготовка HRP-кон'югата 9.3)
 h) додати 50 мкл HRP-кон'югата до всіх лунок.
 і) накрити клейкою плівкою та інкубувати при кімнатній температурі (18-25 ° C) протягом 2 годин , якщо доступно, на шейкері мікропланшетів, встановленому на 400 об / хв.
 j) Видаліть клейку плівку і опорожнити лунки. Промийте стріпи мікропланшета 3 рази відповідно до пункту с. протоколу випробувань. Перейдіть відразу до наступного кроку.
 к) прокапати 100 мкл ТМБ субстрату розчину до всіх лунок.
 l) інкубують при кімнатній температурі (18-25 ° C) протягом біля 10 хвилин. Уникайте впливу інтенсивного світла.

Розвиток кольорів на пластині слід контролювати, а реакція субстрату зупиняється (див. Наступну статтю цього протоколу), перш ніж позитивні лунки більше не будуть правильно записуватися. Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору має здійснюватися індивідуально для кожного аналізу.

Рекомендується додати стоп розчин, коли найвищий стандарт розвине темно-синій колір. Альтернативно, розвиток кольору можна контролювати рідером ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід зупинити, як тільки Стандарт 1 досягне ОГ 0,9-0,95.

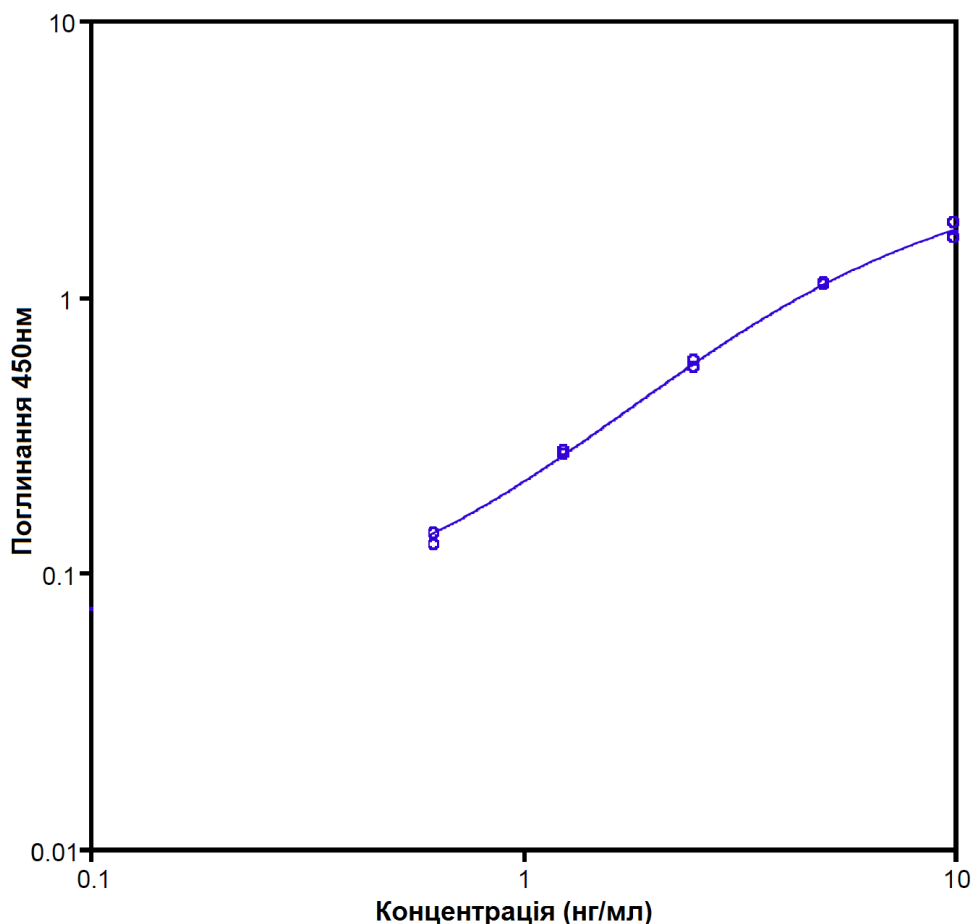
m) Зупиніть реакцію ферменту, швидко піпетуючи 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку. Це важливо, щоб стоп розчин швидко і рівномірно поширювався по всьому мікропланшету, щоб повністю ініціювати фермент. Результати слід читати відразу після додавання стоп розчину або протягом однієї години, якщо стріпи мікропланшета зберігаються при температурі 2 - 8 ° C у темряві.

n) зчитайте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм в якості довжини первинної хвилі (необов'язково 620 нм як еталонна довжина хвилі, 610 нм - до 650 нм прийнятне). Налаштуйте рідер планшета згідно з інструкціями виробника, використовуючи лунки порожні (бланк). Визначимо поглинання як зразків, так і стандартів.

Примітка: У разі інкубації без струшування отримані значення О.Г. можуть бути нижче, ніж вказано нижче. Тим не менш результати все ще дійсні.

11. Розрахунок результатів

- обчислення середніх значень поглинання для кожного набору дублікатів стандартів та зразків. Дублікати повинні бути не більше 20 відсотків від середнього значення.
- створіть стандартну криву шляхом нанесення середньої абсорбції для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації ІСАМ-1 людини на абсцисі. Намалюйте найкращу відповідну криву через точку графіка (рекомендується використовувати 5-параметрову криву).
- щоб визначити концентрацію циркулюючого людського ІСАМ 1 для кожного зразка, спочатку знайдіть середню абсорбцію на ординаті і витягніть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину простягніть вертикальну лінію до абсциси та прочитайте відповідну концентрацію ІСАМ-1 людини.
- **Якщо інструкції в цьому протоколі були виконані, зразки були розведені 1: 100, і концентрація прочитана зі стандартної кривої повинна бути помножена на коефіцієнт розведення (x 100) .**
- **Розрахунок зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до некоректних, низьких рівнів людського ІСАМ-1. Такі зразки потребують додаткового зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень людського ІСАМ-1 з розчинником зразку для точного кількісного визначення фактичного рівня людського ІСАМ-1.**
- передбачається, що кожен з досліджуваних майданчиків встановлює контрольний зразок відомої концентрації ІСАМ-1 людини і проганяє цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення не знаходяться в межах очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Репрезентативна стандартна крива показана на малюнку 7. Ця крива не може бути використана для отримання результатів тестування. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих стріпів мікропланшету.



Репрезентативна стандартна крива для аналізу ІФА ІСАМ-1 людини. ІСАМ-1 людини розбавили в серійних 2-кратних стадіях розчиннику зразка. Не використовуйте цю стандартну криву для

Версія 13.11.14 (24)

отримання результатів тестування. Стандартна крива повинна виконуватися для кожної групи стріпів мікропланшету.

Таблиця 2

Типові дані, що використовують ICAM-1 людини ІФА

Вимірювана довжина хвилі: 450 нм

Референтна довжина хвилі: 620 нм

стандарт	концентрація ICAM-1 людини (пг/мл)	ОГ при 450 нм	Середня ОГ при 450 нм	C.V. (%)
1	10.00	1.850 1.874	1.862	0.9
2	5.00	1.200 1.172	1.186	1.7
3	2.50	0.574 0.549	0.561	3.2
4	1.25	0.288 0.246	0.267	11.1
5	0.63	0.098 0.110	0.104	8.2
заготовка	0	0.005 0.008	0.006	23.1

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов проведення аналізу (наприклад, оператор, метод піпетування, техніка для промивки або температурні ефекти). Більше того, термін зберігання комплекту може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Вимірювані значення досі дійсні

12. Обмеження

- Оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути встановлена для кожного пробігу.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків екрану або реагентів або перехресне забруднення між реагентами може призвести до помилкових результатів.
- Одноразові наконечники піпетки, колби або склотари є переважними, скляна тара, що повторно використовується, повинна бути прополоскана та ретельно промита з усіма миючими засобами перед використанням.
- Неправильне або недостатнє промивання на будь-якому етапі процедури приводить до хибно-позитивних або хибно-негативних результатів. Опорожнити лунки повністю перед дозуванням свіжого миючого розчину, наповніть промивним буфером, як зазначено для кожного циклу промивки, і не дозволяйте лункам залишатись сухими протягом тривалого періоду часу.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість людей з людськими анти-мишачими IgG антитілами (НАМА). НАМА може впливати на аналізи з використанням мишачого моноклонального антитіла, що призводять до помилкових результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів все ще можуть бути проаналізовані в таких аналізах, коли мишачі імуноглобуліни (сироватка, до зразка додають асцитичну рідину, або моноклональні антитіла з неактуальною специфічністю).

13. Характеристики виконання

13.1. Чутливість.

Межа виявлення ICAM-1 людини, визначена як концентрація аналіту, внаслідок чого поглинання значно вище, ніж у середньому розведенні (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено 0.33 нг / мл (середнє значення 6 незалежних аналізів) .

13.2. Відтворюваність

13.2.1. В аналізі

Відтворюваність в аналізі оцінювали в 2 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з 6 повторами з 8 сироваткових екземплярів, що містять різні концентрації ICAM-1 людини. На кожній пластині запустили 2 стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію ICAM-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного прикладу (див. Табл. 3). Розрахований загальний коефіцієнт варіації в аналізі становив 5,6%.

Таблиця 3.

Середня концентрація людського ICAM-1 та коефіцієнт варіації для кожного зразка.

зразок	експеримент	Середня концентрація ICAM-1 людини (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	162,94	6.4
	2	142.98	9.0
2	1	205.95	8.5
	2	178.08	4.8
3	1	238.82	8.1
	2	240.28	4.2
4	1	330.70	6.3
	2	328.30	4.2
5	1	665.50	11.2
	2	645.34	2.9
6	1	906.14	8.6
	2	1004.68	2.4
7	1	981.12	6.6
	2	929.24	1.9
8	1	1217.00	3.3
	2	1119.80	1.2

13.2.2. Між аналізами

Відтворюваність від аналізу до аналізу в межах однієї лабораторії оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожний аналіз проводили з 6 повторами з 8 сироваткових зразками, що містять різні концентрації ICAM-1 людини. 2 стандартні криві проганяли на кожному планшеті. Дані нижче показують, що середня концентрація ICAM-1 людини і коефіцієнт варіації розраховуються на 12 визначеннях кожного зразка (див. Табл. 4). Розрахунковий загальний коефіцієнт варіації між аналізами становив 7.8%.

Таблиця 4. Середня концентрація ICAM-1 та коефіцієнт варіації кожного зразка

зразок	Середня концентрація людського ICAM-1 (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	135.94	14.4
2	172.77	11.8
3	239.58	4.2
4	331.13	7.4
5	585.07	10.1
6	957.18	3.3
7	925.74	3.9
8	1087.58	7.7

13.3. Відновлення збагачення.

Відновлення збагачення оцінювалось збагаченням 4 рівнів ICAM-1 людини в 3 зразках сироватки. Відновлення визначалося з 3 незалежними експериментами з 4 повтореннями кожний. Кількість ендogenous ICAM-1 людини у незбагачених сироваткових зразках була віднімана від значень збагачених. Відновлення варіювалося від 80% до 130% при загальному середньому відновленні 103%.

13.4. Розведення паралелізм

Проаналізовано 4 зразка сироватки з різним рівнем ICAM-1 людини при послідовному 2-кратному розведенні з 4 повторами кожен. Відновлення коливалося в межах від 83% до 121% з загальним відновленням 100% (див. Таблицю 5).

Таблиця 5

зразок	розведення	Очікувана концентрація ICAM-1 людини (нг/мл)	Спостерігаєма концентрація ICAM-1 людини (нг/мл)	Відновлення Очікуваної концентрації ICAM-1 людини (%)
1	1:100	-	401,9	-
	1:200	201,0	203,0	101
	1:400	100,5	98,7	98
	1:800	50,3	48,2	96
2	1:100	-	260,9	-
	1:200	130,5	108,6	83
	1:400	65,2	58,1	89
	1:800	32,6	38,4	118
3	1:100	-	638,7	-
	1:200	319,4	349,7	110
	1:400	159,7	180,5	113
	1:800	79,8	96,5	120,9
4	1:100	-	177,6	-
	1:200	88,8	77,9	87,7
	1:400	44,4	37,3	84,0
	1:800	-	-	-

13.5. Стабільність зразка

13.5.1. Стабільність заморожування-відтавання.

Роздрібнені зразки сироватки (збагачені або незбагачені) зберігали при -20 ° C і відтавали 5 разів, а рівні ICAM-1 людини визначали. Було виявлено істотне зниження імунореактивності ICAM-1 людини. Тому зразки слід зберігати роздрібненими при -20 ° C і розморожувати лише один раз.

13.5.2. Стабільність зберігання

Роздрібнені зразки сироватки (збагачені або незбагачені) зберігали при -20 ° C, 2-8 ° C, кімнатній температурі (КТ) і при 37 ° C, а рівень ICAM-1 людини визначався через 24 .48 і 96 год. Не спостерігалось значної втрати імунореактивності ICAM-1 людини під час зберігання при вищезазначених умовах.

13.6 Порівняння сироватки та плазми

З 3 осіб сироватку, а також ЕДТА, цитрат і гепарин плазми, отримані в той же час показники оцінювали. Рівні ICAM-1 людини істотно не відрізнялися і тому всі ці препарати крові придатні для визначення ICAM-1 людини

13.7. Специфічність.

Вплив циркулюючих факторів імунної системи був оцінений шляхом збагачення цих білків фізіологічно релевантними концентраціями в позитивній сироватці ICAM-1 людини. Не було виявлено перехресної реактивності з TNF-R (60 кДа), TNF-R (80 кДа), IL-8 / NAP-1, TNF-альфа, TNF-бета, IFN-гамма, IFN-альфа 2C, IFN омега, IL-6, IL-2R, ELAM-1 і L- селектином.

13.8 Очікувані значення

Панелі 40 сироватки, а також EDTA, цитрат і гепарин плазми зразки з випадково вибраних, очевидно, здорових донорів (чоловіків і жінок) тестували на ICAM-1 людини. Виміряні рівні можуть змінюватися залежно від використовуваного збору зразків.

Для виявлених людських рівнів ICAM-1 див. Таблицю 6.

Матриця зразка	Кількість Оцінених зразків	Діапазон (нг/мл)	Середнє (нг/мл)	Стандартне відхилення (нг/мл)
сироватка	40	52,7-1047,2	518,7	178,4
Плазма (EDTA)	40	325,8-1009,4	572,1	120,4
Плазма (цитрат)	40	40,7-669,6	376,1	135,2
Плазма (гепарин)	40	100,5-589,4	317,5	135,6

14 Інформація щодо замовлення

За замовленням, будь ласка, звертайтеся: Див останню сторінку

Для технічної інформації звертайтеся: електронна адреса: IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com.

15. Підсумок підготовка реагентів

15.1. Промивний буфер (1x)

Додати концентрат промивного буферу 20x (50мл) до 950мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (мл)	Дистильована вода (мл)
1-6	25	475
1-12	50	950

15.2. Буфер аналізу (1x)

Додають буфер аналізу концентрат 20x (5мл) до 95мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Промивний буфер концентрат (мл)	Дистильована вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

15.3. HRP-кон'югат.

Зробіть 1: 60 розчин HRP-кон'югату в буфері аналізу (1x):

Кількість стріпів	Біотин-кон'югат (мл)	Буфер аналізу (1x) (мл)
1-6	0,05	2.95
1-12	0,10	5.90

16. Підсумок протокол випробувань

1. Попередньо розведіть зразки сироватки і плазми із розчинником Зразка 1:100.
2. Визначте кількість необхідних стріпів мікропланшету.
3. Промийте стріпи мікропланшету двічі з промивним буфером.
4. Стандартне розведення на мікропланшеті: додайте 100мкл розчиннику зразку, у двох примірниках, до всіх стандартних лунок, залишаючи перші лунки порожніми. Прокапати по 200мкл підготовлених стандартів в перші лунки і створити стандартні розведення переносячи 100 мкл з лунки в лунку. Видалити 100 мкл з останньої лунки.
Альтернативно, зовнішнє стандартне розведення в пробірках (див. 9.4.1): прокапати 100 мкл стандартних розведень в стріпах мікропланшету.
5. Додайте 100 мкл розчинника зразків, у двох примірниках до порожніх лунок (бланк).
6. Додайте 100 мкл попередньо розведеного зразка у двох примірниках до призначених лунок зразку.
7. Приготувати HRP-кон'югат.
8. Додати 50 мкл HRP – кон'югату в усі лунки.
9. Покрийте стріпи мікропланшету і інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (Від 18 ° до 25 ° C).
10. Опорожнити та промити стріпи мікропланшету 3 рази з промивним буфером.
11. Додайте 100 мкл ТМБ розчину субстрату в усі лунки.
12. Інкубуйте стріпи мікропланшету приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (від 18 до 25 ° C).
13. Додайте 100 мкл стоп розчину до всіх лунок.
14. Налаштуйте рідер мікропланшетів та вимірюйте інтенсивність кольору 450 нм.

Примітка. Якщо інструкції в цьому протоколі були дотримані, зразки були розведені 1: 100, концентрацію, прочитану зі стандартної кривої, потрібно помножити на Коефіцієнт розведення (x 100) .

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОВОГО (-ИХ) НАБОРУ (ІВ). ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел.:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург,	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
	Німеччина	WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua