

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВИТАМИНА В-12

## 7625-300, Vitamin B-12 Test System

Каталог. № : 7625-300  
Количество : 96  
Производитель: **Monobind (США)**

Методика от 23-08-2013  
Версия 3



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### 1.0 ВВЕДЕНИЕ

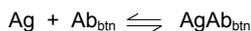
**Назначение:** количественное определение концентрации Витамина В-12 в человеческой сыворотке с помощью ИФА, Колориметрический.

### 2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА (См. оригинал инструкции).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

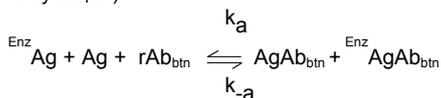
#### Конкурентный иммуноанализ с задержкой (тип 9):

Настоящие реагенты, требующиеся для твердофазного иммуоферментного анализа, включают антитела, конъюгат фермента с антигеном и нативный антиген. При смешивании биотинилированных антител с антигеном, содержащим сыворотку, происходит реакция между антигеном и антителом. Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



$Ab_{b1n}$  = биотинилированные антитела  
 $Ag$  = антиген (переменное количество)  
 $AgAb_{b1n}$  = комплекс антиген-антитело

После короткой инкубации добавляется ферментный конъюгат (это отложенное на позже добавление позволяет повысить чувствительность для образцов с низкой концентрацией). После добавления ферментного конъюгата происходит конкуренция между ферментным аналогом и антигеном в образце за ограниченное количество связывающих сайтов (не использованных в первой инкубации).



$Ag$  = конъюгат фермент-антиген (постоянная величина)

$AgAb_{b1n}$  = комплекс конъюгат – антитела

$rAb_{b1n}$  = биотинилированное антитело, не прореагировавшее во время первой инкубации

$k_a$  = константа скорости ассоциации

$k_{-a}$  = константа скорости диссоциации

$K = k_a / k_{-a}$  = константа равновесия

Происходит реакция между биотином, связанным с антителами и стрептавидином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Это позволяет отделить фракцию, связавшуюся с антителами, при декантировании или аспирации.



Стрептавидин<sub>sw</sub> = стрептавидин, иммобилизованный в лунках  
Иммобилизованный комплекс = «сэндвич» комплекс, связанный с твердой фазой (поверхностью лунок)

Активность фермента во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация в образцах.

### 4.0 РЕАГЕНТЫ

#### Поставляемые материалы:

- A. Калибраторы Витамина В-12 - 1 мл/флакон - значки А-Ф**  
6 флаконов референсной сыворотки с концентрациями Витамина В-12 0 (А), 100 (В), 200 (С), 400 (D), 1000 (Е) и 2000 (F) пг/мл. Хранить при 2-8 °С. Содержат консерванты. Концентрации стандартов могут быть выражены в молях (пмоль/л), умножением на коэффициент 0.738. Например: 100 пг/мл x 0.738 = 7.38 пмоль/л
- В. Ферментный реагент Витамина В-12 – 7.0 мл/флакон - значок  $\text{E}$**   
Один флакон, содержащий Витамин В-12 (аналог) с пероксидазой хрена (HRP) в белковом стабилизирующем растворе. Хранить при 2-8 °С.
- С. Биотинилированный Витамин В-12, 7.0 мл/флакон, значок  $\nabla$**   
Один флакон, содержащий биотинилированные антитела к Витамину В-12, очищенные конъюгированные кроличьи IgG в буфере, синий краситель, консервант. Хранить при 2-8 °С.
- D. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок  $\Downarrow$**   
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запаянный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8 °С.
- E. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок  $\blacktriangledown$**   
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30 °С.
- F. Субстрат - 12 мл/флакон - значок S<sup>N</sup>**  
Один флакон, содержащий ТМБ и перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8 °С.
- G. Стоп-раствор - 8мл/флакон - значок  $\text{STOP}$**   
Один флакон, содержащий сильную кислоту (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Хранить при 2-30 °С.
- H. Высвобождающий Агент - 12 мл/флакон - значок**  
Один флакон, содержащий сильное основание (гидроксид натрия) и цианид калия.
- I. Стабилизирующий Агент – 0.5 мл/флакон – значок**  
Один флакон, содержащий раствор ТСЕР.
- J. Нейтрализующий Буфер - 7 мл/флакон – значок NZ**  
Один флакон, содержащий буфер, понижающий pH экстракции образца.
- K. Инструкция к набору.**

**Замечание 1:** Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

**Замечание 2:** Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8 °С.

**Замечание 3:** Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

### 4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозаторы на 50 и 100 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Диспенсеры переменного объема (200-1000 мкл) для конъюгата
4. Стелянные тестовые пробирки для калибраторов, контролей и образцов.
5. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
6. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
7. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
8. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
9. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
10. Таймер
11. Контрольные материалы

### 5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*  
Не для внутреннего или наружного использования на людях  
или животных**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

## 6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служит сыворотка крови, плазма. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °С на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.100 мл образца.

## 7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

## 8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

### 1. Буфер для промывок

Разведите концентрат промывочного буфера до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в подходящем сосуде. Храните при комнатной температуре (2-30 °С) до 60 дней.

**Замечание 1:** Не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

**Замечание 2:** Не использовать загрязненные реагенты или реагенты с видимым ростом бактерий.

### 2. ЭКСТРАКЦИОННЫЙ АГЕНТ

Добавить аликвоту стабилизирующего агента для приготовления раствора для разведения 1/40 (стабилизирующий агент/высвобождающий агент). Например, для приготовления 4 мл (4000 мкл), добавить 0.100 мл (100 мкл) стабилизирующего агента к 3.9 мл (3900 мкл) высвобождающего агента.

### 3. ЭКСТРАКЦИЯ ОБРАЗЦА

Подготовить достаточное количество тестовых пробирок для всех образцов пациента, контролей и калибраторов. Внести 0.10 мл (100 мкл) всех образцов в индивидуальные тестовые пробирки. Пипетировать 0.050 мл (50 мкл) подготовленного экстракционного агента в каждую тестовую пробирку, встряхивая (см. замечание 3) после каждого добавления. Оставить для реакции на 15 минут. По окончании 15 минут внести 0.050 мл (50 мкл) нейтрализующего буфера, встряхивая (см. замечание 3) после каждого добавления, закончить экстракцию.

**Замечание 3:** Рекомендуется использовать мультисенсорный (3) вортекс.

**Замечание 4:** Очень важно точное внесение корректного объема с использованием калиброванной пипетки и внесение на дно стеклянных пробирок под углом, слегка касаясь стенок пробирки.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27 °С).

**\*\*Процедура теста должна проводиться опытным лаборантом или подготовленным профессионалом.**

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °С.**
2. Пипетировать 0.050 мл (50 мкл) соответствующего экстрагированного Витамина В-12 калибратора, контроля или образца в подготовленную лунку.
3. Добавить по 0.050 мл (50 мкл) Биотинового Реагента Витамина В-12 в каждую лунку.
4. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
5. Накройте и инкубируйте 45 минут при комнатной температуре.
6. Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) Ферментного Реагента Витамина В-12 в каждую лунку.  
**Добавлять точно сверху на внесенные в лунки реагенты.**
7. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.

8. Накройте микропланшет и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
9. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
10. Добавьте 0.350 мл (350 мкл) буфера для промывок (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
11. Добавьте по 0.100 мл (100 мкл) Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**  
**НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА**
12. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
13. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 0.050 мл (50 мкл) стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
14. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

**Замечание:** Образцы с концентрацией выше 2000 пг/мл необходимо развести, в 5 и/или в 10 раз, стандартом «0» и повторить анализ.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации Витамина В-12 в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации Витамина В-12 в пг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите концентрации Витамина В-12 в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 1.202 пересекает стандартную кривую при 160 пг/мл (см. рис. 1)

**ПРИМЕР 1**

Образец	Положение лунки	Абсорбция (А)	Среднее абсорбции (В)	Концентрация пг/мл
Калибратор А	A1	2.898	2.89	0
	B1	2.891		
Калибратор В	C1	2.495	2.45	100
	D1	2.415		
Калибратор С	E1	2.107	2.06	200
	F1	2.023		
Калибратор D	G1	1.544	1.51	400
	H1	1.468		
Калибратор E	A2	0.662	0.63	1000
	B2	0.604		
Калибратор F	C2	0.263	0.25	2000
	D2	0.239		
Образец	G2	1.479	1.53	391.4
	H2	1.573		

\* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

**Рисунок 1**

(См. оригинал инструкции).

## 11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

**Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:**

1. Оптическая плотность Калибратора 0 пг/мл должна быть  $\geq 1.3$
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

## 12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

### 12.1 Проведение анализа

- Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
- Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
- Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
- Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
- Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
- Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
- Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
- Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
- Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
- Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
- Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных Monobind Inc., может быть запрошен у [Monobind@Monobind.com](mailto:Monobind@Monobind.com).

### 12.2 Интерпретация

- Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.
- Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализов.
- Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
- Производитель не несет ответственности за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
- Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

## 13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции, ожидаемые значения при использовании данного метода приведены в таблице 1:

ТАБЛИЦА 1

Ожидаемые значения для Тестовой Системы Витамин В-12

Население	пг/мл	пмоль/л
Новорожденные	160 - 1300	118 - 959
Взрослые	200 - 835	148 - 616
Взрослые > 60 лет	110 - 800	81 - 590

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2

Воспроизводимость внутри серии (пг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Низкий	20	334.8	24.3	7.3 %
Нормальный	20	484.9	17.6	3.6 %
Высокий	20	925.3	28.3	3.1 %

ТАБЛИЦА 3

Воспроизводимость между сериями (пг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Низкий	18	314.9	49.4	15.7 %
Нормальный	18	441.3	46.7	10.6 %
Высокий	18	913.1	39.4	4.8 %

\*Измерения проводились в 10 постановках в дублях в течение 10 дней.

### 14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 70.13 пг/мл. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (мкг/дл) плюс 2σ (σ – стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

### 14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным хемилюминесцентным методом. Использовались образцы с низким, средним и высоким содержанием Витамина В-12 (диапазон значений 156 - 1830 пг/мл). Общее число образцов было 58. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для данного метода Testosterone EIA в сравнении с референсным методом. Полуценные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод (Y)	654.3	y = 1.0186x - 48.82	0.9506
Метод сравнения (X)	690.2		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

### 14.4 Специфичность

Перекрестные реакции антител к Витамину В-12 с различными веществами оценивались добавлением влияющих веществ в сыворотку в различных концентрациях. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой влияющего вещества и дозой Витамина В-12, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Перекрестная реактивность
Билирубин	0.0003
Ревматоидный фактор	0.0008
Кобинамид	< 0.0001
Липемия	< 0.0001
Гемоглобин	< 0.0001



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)