

НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИН D- СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

K 2314, Vitamin D binding protein

Каталог. № : K 2314
Количество : 96
Производитель: **Immundiagnostik**
AG (Германия)

Методика от 05-07-2012



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

Только для использования в *in-vitro* диагностике

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ предназначен для количественного определения витамин D-связывающего белка в образцах сыворотки, плазмы и мочи. Только для диагностики In-Vitro.

2. ВВЕДЕНИЕ

(См. оригинал инструкции)

3. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Этот ИФА является иммуноанализом типа сэндвич для определения VDB в сыворотке, плазме и моче. Лунки микропланшета покрыты поликлональными анти-VDB антителами. На первой стадии инкубации VDB в образцах связываются с поликлональными антителами кролика (в избытке). Для удаления всех несвязанных веществ проводят стадию промывки. На второй стадии инкубации добавляются поликлональные меченые пероксидазой кроличьи анти-VDB антитела. После очередного этапа промывки, чтобы удалить все несвязанные вещества, твердую фазу инкубировали с субстратом, Тетраметилбензидин. После этого добавляется кислый стоп раствор для остановки реакции. Цвет меняется на желтый. Интенсивность желтого цвета прямо пропорциональна концентрации VDB в образце. Строится кривая поглощения (при 450 nm).

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Кат. №	Содержание	Компоненты набора	Кол-во
K2314MTP	PLATE	Один держатель с предварительно покрытыми полосками	96
K2314WP	WASHBUF	Концентрат Промывочного буфера (10x)	2 x 100 мл
K2314K	CONJ	POD-антитела, предварительно разведенный	1 x 200 мкл
K2314ST	STD	Калибраторы, лиофилизированные (60; 20; 6.6; 2.2; 0 нг/мл)	4 x 5 флаконов
K2314SV	STDBUF	Буфер для разведения стандартов	1 x 20 мл
K2314KO1	CTRL	Контроль, лиофилизированный	4 флакона
K2314KO2	CTRL	Контроль, лиофилизированный	4 флакона
K2314PV	SAMPLEBUF	Буфер для разведения образца	2 x 100 мл
K2314TMB	SUB	Субстрат ТМБ	1 x 15 мл
K2314AC	STOP	Стоп раствор, готов к использованию	1 x 15 мл

5. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Ультрочистая вода
- Лабораторный баланс
- Прецизионные пипетки и одноразовые наконечники 10-1000 мкл
- Фольга для накрытия планшета
- Горизонтальная мешалка
- Многоканальный дозатор или повторный дозатор
- Центрифуга со способностью 3000 x g
- Мешалка Vortex
- Стандартные лабораторные стеклянные или пластиковые флаконы, пробирки и т.д.
- Микропланшетный ридер при 540 nm

6. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Для выполнения анализа более одного раза, убедитесь, что реагенты хранятся в условиях, указанных на этикетке. **Подготовьте только соответствующее количество, необходимое для каждого анализа.** Комплект может

использоваться до 4 раз в течение срока годности, указанного на этикетке.

- Реагенты с объемом менее **100 мкл** следует центрифугировать перед использованием, чтобы избежать потери объема.
- WASHBUF** (концентрат промывочного буфера) следует разбавить ультрочистой водой **1:10** перед использованием (100 мл WASHBUF + 900 мл ультрочистой воды), хорошо перемешать. Кристаллы могут возникнуть из-за высокой концентрации солей в растворах. Кристаллы необходимо растворить при 37 °C на водяной бане до разбавления Буферными растворами. **WASHBUF** (концентрат промывочного буфера) стабилен при 2-8 °C до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разводненный **буферный раствор** может храниться в закрытой колбе при температуре **2-8 °C в течение одного месяца**.
- Ллиофилизированные **STD** (стандарты) и **CTRL** (контроли) должны быть восстановлены с **500 мкл** бидистиллированной воды. Оставить флакон на 10 минут для растворения его содержимого и тщательно перемешать, аккуратно переворачивая, до полного растворения. Ллиофилизированные **STD** (стандарты) и **CTRL** (контроли) остаются стабильными при температуре **2-8 °C** до срока годности, указанного на этикетке. Восстановленные стандарты и контроли не стабильны.
- CONJ** (конъюгат) растворить 1:100 в промывочном буфере (100 мкл CONJ + 10 мл промывочного буфера). Неразбавленный **CONJ** (конъюгат) стабилен при температуре **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.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в In-Vitro диагностике.
- Человеческие материалы, используемые в компонентах набора, были испытаны и признаны отрицательными к ВИЧ, гепатиту В и гепатиту С. Тем не менее, по соображениям безопасности, все компоненты набора должны рассматриваться как потенциально инфицированные.
- В состав реагентов входит азид натрия или тимеросал в качестве бактерицидного средства. Натрий азид и тимеросал являются токсичными. Субстраты для ферментативных цветовых реакций токсичны и канцерогенны. Избегать попадания на кожу или слизистые оболочки.
- Стоп раствор состоит из серной кислоты, которая является сильной кислотой. Даже с разбавленным, с ним необходимо обращаться с осторожностью. Он может вызвать химические ожоги; использовать перчатки, защитные очки, и соответствующие защитные одежды. Любое разливание должно быть немедленно устранено с большим количеством воды.
- Не использовать после окончания срока годности.

8. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки/плазмы

Развести все образцы плазмы и сыворотки **1:40.000** с **SAMPLEBUF** (буфер для разведения образца). Например:

10 мкл образца + 990 мкл **SAMPLEBUF** = 1:100 (**Разведение I**)

10 мкл Разведения I + 990 мкл **SAMPLEBUF** = 1:10 000 (**Разведение II**)

250 мкл Разведения II + 750 мкл **SAMPLEBUF** = 1:40 000 (**Разведение III**)

Для анализа пипетировать **100 мкл разведения III** в лунку.

Образцы с уровнями VDB выше максимального значения калибратора следует дополнительно разбавить и повторно анализировать.

Моча

Образцы мочи должны быть разведены **1:10** с **SAMPLEBUF** (буфер для разведения образца). Например:

100 мкл образца + 900 мкл **SAMPLEBUF**

Образцы с уровнями VDB выше максимального значения калибратора следует дополнительно разбавить и повторно анализировать.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Примечания к методике

- Не использовать компоненты из разных партий в пределах одного анализа.
- Руководящие принципы для медицинских лабораторий должны быть соблюдены.
- Время инкубации, температура инкубации и пипетируемые объемы компонентов определяются производителем. Любое

изменение процедуры испытаний, которое не согласовано с производителем, может повлиять на результаты теста. Immundiagnostik AG, следовательно, не может нести ответственность за любой ущерб в результате неправильного использования.

- Анализ всегда следует выполнять в соответствии с прилагаемым руководством.

Процедура теста

Вымойте предварительно покрытый микротитрационный планшет **5 x 250 мкл разбавленным промывочным буфером**. После окончательной промывки, перевернутым планшетом постучать по листу бумаги, чтобы удалить излишки раствора.

Испытания проводить в дублях.

1. Добавить **100 мкл STD** (Стандарт), **CTRL** (Контроли) и **предварительно разведенные пробы** в соответствующие лунки.
2. Инкубировать в течение **1 часа** встряхиванием на горизонтальном миксере при комнатной температуре.
3. Декантировать содержимое Планшета и промыть лунки **5 раз с 250 мкл** разведенного промывочного буфера.
4. Добавить **100 мкл** предварительно разведенного **CONJ** (меченные пероксидазой антитела).
5. Инкубировать в течение **1 часа** встряхиванием на горизонтальном миксере при комнатной температуре.
6. Декантировать содержимое Планшета и промыть лунки **5 раз с 250 мкл** разведенного промывочного буфера.
7. Добавить **100 мкл SUB** (TMB субстрата).
8. Инкубировать в течение **10-20 минут** при комнатной температуре.
9. Добавить **100 мкл STOP** (Стоп раствор) и быстро смешать.
10. Определить **поглощение немедленно** считывателем ELISA при **450 нм** против 620 нм (или 690 нм) в качестве референтного значения. Если референсная длина волны не доступны, считать результат только при 450 нм. Если значение на самом высоком уровне превышает диапазон измерения фотометра, поглощение должно быть измерено непосредственно при 405 нм к 620 нм (или 690 нм) в качестве ссылки.

10. РЕЗУЛЬТАТЫ

Следующие алгоритмы могут быть использованы альтернативно для вычисления результатов. Мы рекомендуем использовать "4-Параметровый-алгоритм".

1. 4-параметрической-алгоритм
Рекомендуется использовать линейную ординату для оптической плотности и логарифмическую абсциссу для концентрации. При использовании логарифмической абсциссы, нулевой калибратор должен быть указан со значением менее 1 (например, 0.001).
2. Расчет от точки к точке
Мы рекомендуем линейную ось ординат для оптической плотности и линейную ось абсцисс для концентрации.
3. Слайд-алгоритм
Мы рекомендуем линейную ось ординат для оптической плотности и логарифмическую ось абсцисс для концентрации. При использовании логарифмической абсциссы, нулевой калибратор должен быть указан со значением меньше 1 (например, 0.001).
Степень достоверности полученных пар значений должна проверяться перед автоматической оценкой результатов. Если эта опция не доступна с используемой программой, контроль парных значений необходимо провести вручную.

Образцы сыворотки/плазмы

Для расчета концентрации VDBP в образцах сыворотки или плазмы, результат следует умножить на **40 000**.

Образцы мочи

Для расчета концентрации VDBP в образцах мочи, результат надо умножить на **10**.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ

Образцы VDB со значениями, большими, чем самое высокое стандартное значение, следует дополнительно разбавить и повторно протестировать.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Immundiagnostik рекомендует использовать коммерческие контрольные образцы для внутреннего контроля качества.

Контрольные образцы должны анализироваться в каждом анализе. Результаты, полученные от анализа контрольных образцов, должны

быть оценены на приемлемость использования соответствующих статистических методов. Результаты для образцов пациента могут быть не действительными, если в течение одного и того же анализа одно или больше значений контрольных образцов находятся вне допустимых пределов.

Ожидаемые значения

Нормальный диапазон значений

Перечисленные ниже уровни должны использоваться только в качестве ориентира. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные предполагаемые пределы для данной популяции пациентов.

Сыворотка или плазма 20-55 мг/дл
(MW = 51 243 Da, позиции 17-474,458 аминокислоты, PO2774 VTDB_HUMAN)

Отклонения от заданного диапазона могут присутствовать в случае:

- **Беременности** (повышенные) или 124,9 мг/дл^[2]
- **Острые нарушения функции печени** (сниженные) 23 мг/дл^[2]

Моча < 200 мкг/л
Повышенные уровни могут указывать на **нефротический синдром**
Моча 0,8 - 34 мг/г общего белка^[1]

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность и воспроизводимость

Точность (внутри анализа) Immundiagnostik VDB ИФА теста рассчитывали из 16 повторных определений на каждом из образцов. Внутрисерийный CV: n = 16

Образец	Среднее значение VDB (мг/дл)	CV, %
1	24.2	5.0
2	42.9	3.2

Общая точность (между сериями) Immundiagnostik VDB ИФА теста была рассчитана по данным 1 образца, полученным в 14 различных анализах тремя техниками в двух разных партиях реагентов в течение трех месяцев.

Межтестовая точность: n = 14

Образец	Среднее значение VDB (мг/дл)	CV, %
1	19.3	12.7

Чувствительность

n=22

Образец	Среднее значение VDB, OD	Вариативность стандарта	Предел обнаружения (нг/мл)
1	0.025	0.003	1.23

Восстановление

Две пробы были обогащены калибратором VDB и тестированы с помощью этой анализа.

Восстановление n = 2

Образец (нг/мл)	Насыщение (нг/мл)	Ожидаемое VDB (нг/мл)	Измеренное VDB (нг/мл)
2.2	5	7.5	7.7
2.2	10	12.2	12.7
2.2	20	22.2	25.3
6.7	2.5	9.2	8.7
6.7	7.5	14.2	13.1
6.7	15	21.7	22.5

Разведение образцов

Два образца пациента разбавляли буфером разбавления. Результаты показаны ниже:

Линейность: n = 2

Образец	Разведение	Ожидаемое (мг/дл)	Измеренное (мг/дл)
	1:5000	46.2	46.2
	1:10000	23.1	23.3
	1:20000	11.5	10.4
	1:40000	5.7	5.8
	1:80000	2.8	2.7
	1:5000	38	38
	1:10000	19	20.2
	1:20000	9.5	8.7
	1:40000	4.7	4.3
	1:80000	2.3	2.4

14. ЛИТЕРАТУРА (См. Оригинал инструкции).

15. 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.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com