

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОПЛАНШЕТА, ПОКРЫТОГО LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

KIF005, ID-Vit® Folic acid

Каталог. № : KIF005

Методика от 13-03-2012

Количество : 96

Производитель: Immundiagnostik

AG (Германия)



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ID-Vit® Folic acid является микробиологическим тестом в микропланшетном формате и предназначен для измерения общей концентрации фолиевой кислоты в сыворотке. В набор входят все необходимые реагенты, такие как стандарты, среда и микропланшет, покрытый клетками специфического микроорганизма, необходимые для 96 определений, включая построение калибровочной кривой. Для оценки содержания фолиевой кислоты необходим микропланшетный спектрофотометр (ридер). Набор предназначен только для диагностики *in vitro*, для медицины, ветеринарии и научных исследований.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Фолиевая кислота - водорастворимый витамин группы В (витамин В₉), легко разрушаемый при нагревании, участвует в процессах роста и развития организма. Фолиевая кислота необходима для формирования эритроцитов, для нормального функционирования костного мозга и нервной системы. Фолиевая кислота необходима для деления клеток и очень важна для правильного развития плода. Большая часть продуктов растительного или животного происхождения содержит фолиевую кислоту, но дефицит фолиевой кислоты - наиболее распространенный авитаминоз в Европе и Северной Америке. По статистике только один из четырех немцев получает с пищей достаточное количество фолиевой кислоты. Это является результатом несбалансированной диеты, с очень низким содержанием свежих фруктов и овощей. Кроме того, к нарушениям всасывания и ассоциированному с этим авитаминозу могут привести пожилой возраст, различные заболевания, специфические лекарственные препараты, например, котримоксазол. Низкий уровень фолиевой кислоты может быть обусловлен:

- сниженным поступлением (например, из-за алкоголизма или антагонистов фолиевой кислоты),
- нарушением всасывания (например, при целиакии)
- повышенной потребностью (например, во время беременности, при анемии или злокачественных заболеваниях).

Симптомы авитаминоза

Первыми симптомами недостатка фолиевой кислоты являются слабость, раздражительность, проблемы концентрации внимания и потеря аппетита; затем последовательно развиваются воспаление слизистых оболочек, анемия и тяжелые неврологические расстройства. Во время беременности, когда потребность в фолиевой кислоте удваивается, дефицит фолиевой кислоты может привести к преждевременным родам и тяжелым патологиям развития плода (в особенности, мальформации позвоночника и головного мозга). Дополнительное назначение фолиевой кислоты во время беременности может снизить риск развития дефектов нервной трубки на 85%.

Дефициты фолиевой кислоты, и витамина В₁₂ могут привести к развитию мегалобластической анемии, поэтому важно выполнять сочетанное определение двух витаминов. В этом случае можно точно определить, недостаток какого витамина вызвал заболевание и правильно назначить лечение. В противном случае, если мегалобластическая анемия вызвана дефицитом витамина В₁₂, лечение препаратами фолиевой кислоты может привести к необратимым повреждениям центральной

нервной системы.

Фолиевая кислота и атеросклероз

Дефицит фолиевой кислоты является одной из основных причин гипергомоцистеинемии. А она, в свою очередь, является независимым фактором риска раннего развития атеросклероза. Определения уровня фолиевой кислоты можно проводить в рамках анализа риска развития коронарного заболевания сердца. Кроме влияния на уровень гомоцистеина, показаны положительные эффекты фолиевой кислоты на функции эндотелия у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Возможные области применения определений фолиевой кислоты:

- Гиперхромная Макроцитарная анемия
- Длительная терапия противосудорожными препаратами или антагонистами фолиевой кислоты
- Гемодиализ в течение длительного времени
- Беременность
- Усиленный эритропоэз
- Хронические заболевания печени
- Гемобластоз
- Псориаз, дерматиты
- Стоматит, глоссит
- Хронический алкоголизм

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сыворотки разбавляются буферным раствором. Разбавленные образцы вносят в лунки микропланшета, покрытые *Lactobacillus rhamnosus*, метаболизирющие фолиевую кислоту. Добавление витамина, присутствующего в стандартах [STD] или образцах, приводит к витамин-зависимому росту, до тех пор, пока витамин не израсходуется. После инкубации при 37°C в течение 48 часов, рост *Lactobacillus rhamnosus* измеряется турбидиметрически при длине волны 610 - 630 нм (или, альтернативно, при длине волны 540 - 550 нм) на микропланшетном фотометре. По полученным значениям оптической плотности (ОП) для серийных разведений строится калибровочная кривая. Количество витамина в образце прямо пропорционально считанному значению ОП образца и вычисляется по калибровочной кривой.

4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Кат. №	Обозначение	Компонент набора	Кол-во
KIF005MTP	PLATE	Микропланшет, покрытый <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , готов к использованию	12 x 8 лунок
KIF005SO	SOL	Буфер для подготовки образцов, 5 мл, готов к использованию	4x
KIF005DI	DIL	Вода, 30 мл, готова к использованию	4x
KIF005ME	ASYMED	Рабочая среда	4x
KIF005ST	STD	Стандарт фолиевой кислоты	4x
KIF005FO	FOL	Пленка для заклеивания стрипов	4x
KIF005FR	FRA	Держатель для микропланшетов	1x
KIF005BU	ASYBUF	Буфер для подготовки среды, 1,5 мл	4x
KIF005KO1	CTRL 1	Контроль фолиевой кислоты 1	4x
KIF005KO2	CTRL 2	Контроль фолиевой кислоты 2	4x

5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Инкубатор на 37 °C с темной камерой
- Водяная баня (90 °C - 100 °C)
- Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с возможностью измерений при длине волны 610 - 630 нм (540 - 550 нм)
- Микропипетки 20 - 200 мкл
- Микропипетки 100 -1000 мкл
- Стерильные наконечники к микропипеткам на 20 - 200 мкл и 100 -1000 мкл
- Пипетки на 5 и 10 мл
- Стерильные пробирки объемом 1,5 - 2 мл
- 0,2 мкм стерильный полиэфирсульфоновый фильтр со стерильным наконечником
- Стерильные центрифужные пробирки, 15 мл (например пробирки Falcon)
- Центрифуга (10 000 x g)

6. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Храните все реагенты набора при 2-8 °C

- Для каждой постановки готовьте свежие реагенты и используйте их сразу после приготовления. Вылейте неиспользованные реагенты и утилизируйте отходы согласно установленным государственным, федеральным или локальным правилам.
- Поместите неиспользованные реагенты (стандарт, среда) обратно в коробку и храните при 2-8 °С.
- Храните неиспользованные стрипы в оригинальной упаковке, с осушителем, тщательно закрытыми, при 2-8 °С, не допускайте контаминации и воздействия влажности.
- После истечения срока годности, указанного на этикетке флакона, никакие гарантии не действуют.
- Если набор используется для нескольких постановок, убедитесь, что все реагенты хранятся в условиях, соответствующих указанным в данной инструкции или на этикетках. Для каждой постановки готовьте только необходимое количество реагентов. Набор может быть использован не более, чем для 4 отдельных постановок в период до истечения срока годности.

7. ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Так как тест основан на микробиологическом методе, необходимо соблюдать, на сколько это возможно, общие рекомендации по работе в **стерильных условиях**, (работа в стерильном боксе, ПЦР-боксе, использование стерильных инструментов или оборудования).
- Необходимо соблюдать правила хорошей лабораторной практики (GLP, Good Laboratory Practice).
- Качество воды** имеет крайнюю важность. Только поставляемая в наборе вода должна использоваться для разведения среды (ASYMED), стандарта и восстановления контролей 1,2, а также для приготовления образцов
- Стандарты для построения калибровочной кривой необходимо тестировать при каждой постановке.
- Стандарты [STD] и образцы рекомендуется анализировать в дублях.
- Если большее разведение образца приводит к получению большего результата анализа, это может означать наличие ингибиторов, например антибиотиков, в образце.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
- Рабочая среда [ASYMED] может вызвать раздражение слизистых оболочек, глаз, и кожи.
- При работе с набором используйте лабораторные перчатки.
- Использованные микропланшеты [PLATE] и материалы, контактировавшие с образцами пациентов, должны утилизироваться как потенциально инфекционно опасный материал.
- Признаки порчи реагентов: Абсорбция самого высокого стандарта должна быть выше 0.6 оптических единиц ($A_{630nm} > 0,6$).

8. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Для анализа данным методом могут быть использованы образцы сыворотки пациентов.
- Образцы до анализа должны храниться в темноте при температуре 2-8° С. Образцы стабильны в течение 8 часов, если хранятся в темноте при температуре 2-8° С. Для более длительного хранения (6-8 недель) образцы должны быть заморожены при температуре -20 °С. Фолиевая кислота чувствительна к свету. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания.
- Гемолиз может привести к ложным результатам, следовательно гемолизные образцы нельзя использовать для анализа. Липемичные образцы необходимо центрифугировать при 13000g перед тестированием.
- Перед тестированием образцы необходимо центрифугировать при 10000g 5 мин и для анализа использовать полученный супернатант.

8.1 Обработка образцов/экстракция

Внесите 100 мкл образца сыворотки или контроля (CTRL 1, 2) в пробирку, содержащую 400 мкл буфера для подготовки образцов [SOL], инкубируйте при 95 °С в течение 30 минут, быстро охладите и центрифугируйте (не менее 5 минут при 10000 g).

8.2 Разведение образцов

Возьмите 50 мкл полученного супернатанта образца или контролей 1 и 2, внесите 700 мкл воды, поставляемой в наборе [DIL] и тщательно перемешайте (альтернативно, 25 мкл полученного супернатанта и 350 мкл воды, поставляемой в наборе [DIL]). Конечное разведение образца после обработки и разведения в 75 раз (= коэффициент разведения).

9. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Замечания по процедуре

- Необходимо соблюдать рекомендации по контролю качества.
- Время инкубации, температура инкубации и вносимые объемы реагентов определены производителем. Любые изменения процедуры анализа, которые не согласованы с производителем, могут повлиять на результаты теста. В этом случае производитель не несет никакой ответственности за последствия неправильной постановки теста.
- Постановку необходимо выполнять в точном соответствии с данной инструкцией.

9.1 Подготовка к анализу

Возьмите необходимое количество стрипов для текущей постановки. Неиспользуемые стрипы поместите обратно в пакет из фольги с осушителем, тщательно закройте его, и положите обратно в холодильник. Перед началом анализа все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры.

Вода [DIL] для разведения среды [ASYMED] и стандарта [STD]

Нажмите на крышку, сдвиньте ее на край флакона, затем удалите герметичную упаковку.

Рабочая среда [ASYMED]

- Необходимо готовить свежую среду для каждой постановки.
- Возьмите пинцетом сухой пакет из флакона со средой [ASYMED], встряхните и выбросьте.
- Внесите 1 мл буфера для подготовки среды, поставляемого в наборе [ASYBUF] и 10 мл воды [DIL] в рабочую среду [ASYMED], тщательно закройте и перемешайте. Полученного количества достаточно для тестирования 6 стрипов.
- Нагрейте флакон со средой [ASYMED] на водяной бане при 90 - 100 °С в течение 5 минут, тщательно перемешивайте не менее двух раз. Убедитесь, что флакон со средой [ASYMED] тщательно закрыт все время.
- Быстро охладите флакон со средой [ASYMED] до температуры ниже 30 °С.
- Стерильно отфильтруйте 10 мл среды [ASYMED] с помощью 0.2 мкм фильтра в центрифужную пробирку (например, пробирку Falcon, объем 15 мл).

Стандарт [STD]

Перед началом тестирования приготовьте свежую серию разведений стандарта для построения калибровочной кривой:

- Откройте флакон со стандартом [STD], положите перевернутую завинчивающуюся крышку на рабочий стол.
- Внесите X мл (X = смотрите сертификат QS, прилагаемый к набору) воды, поставляемой в наборе [DIL], во флакон со стандартом [STD], тщательно закройте и перемешайте (= концентрат стандарта).
- Внесите воду, поставляемую в наборе [DIL], в 6 стерильных пробирок (объемом 1.5-2.0 мл), а затем пипетируйте концентрат стандарта в пробирки. Для приготовления стандартов используйте следующую схему:

Концентрация витамина В ₉ мкг/л	Вода, поставляемая в наборе, [DIL], мкл	Концентрат стандарта [STD], мкл	Общий объем, мкл
Бланк: 0	450	0	450
Стандарт 1: 0,04	450	50	500
Стандарт 2: 0,08	400	100	500
Стандарт 3: 0,16	300	200	500
Стандарт 4: 0,24	200	300	500
Стандарт 5: 0,32	100	400	500

Контроли [CTRL1, CTRL2]

- Для каждой постановки должны быть приготовлены свежие контроли.
- Откройте флакон с контролем, удалите пленку.
- Внесите 0.125 мл воды [DIL] во флакон с контролем [CTRL], закройте флакон и растворите, перемешивая на вортексе (= контроль) – для CTRL1, CTRL2.
- Обрабатывайте растворенные контроли также, как и образцы
- Вносите по 150 мкл растворенных и обработанных контролей [CTRL1, 2] в лунку. Контроли рекомендуется анализировать в дублях.
- Точная концентрация контроля указана в сертификате качества, поставляемом с набором.

9.2 Начальный этап анализа

- Возьмите необходимое количество стрипов и поместите их в рамку-держатель [FRA]. Верните неиспользованные стрипы в оригинальной упаковке, с осушителем, тщательно закрытыми, при 2-8 °С, не допускайте контаминации и воздействия влажности.

- Раствора среды достаточно для тестирования 6 стрипов (= 48 лунок).
- Внесите по 150 мкл рабочей среды [ASYMED] в лунки.
- Внесите 150 мкл разведенных стандартов [STD], контролей 1,2 и образцов в соответствующие лунки. Перед внесением каждого разведения стандарта, контроля или образца промойте наконечник соответствующим стандартом или образцом.
- Тщательно закройте микропланшет пленкой [FOL], прижимая пленку. Важно: лунки должны быть закрыты герметично!
- Инкубируйте при 37 °С в течение 48 часов в инкубаторе.

9.3. Измерения

- Тщательно прижмите пленку [FOL] к лункам.
- Переверните микропланшет [PLATE], поместите его на рабочий стол и перемешайте выросшую культуру.
- Переверните микропланшет [PLATE] обратно и аккуратно удалите пленку [FOL], начиная с правого верхнего угла, сворачивая ее по диагонали, под углом 180°. При этом крепко фиксируйте рукой стрипы в держателе, так как пленка очень липкая.
- Удалите пузырьки воздуха из лунок, используя наконечник дозатора или иглу.
- Считайте оптическую плотность (ОП) с помощью ридера при длине волны 610 - 630 нм (или 540 - 550 нм).

Замечание

- После окончания 48 часовой инкубации, перед измерением ОП микропланшет [PLATE] может храниться в течение 48 часов в холодильнике.
- Если тестирование должно быть проведено перед выходными или праздниками, то считывание ОП можно проводить после 60 часовой инкубации.

10. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Для расчета результатов рекомендуется использовать 4-х параметрическую регрессию. При расчете результатов необходимо учитывать коэффициент разведения образцов.

Сыворотка

Фолиевая кислота, в мкг/л = значение, полученное из калибровочной кривой x коэффициент разведения (= 75)

Ожидаемые значения

Фолиевая кислота: 3,8-23,2 г/л (n = 74)

Замечание: диапазон концентраций 3-24 мкг/л покрывается при использовании коэффициента разведения 75.

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений, в зависимости от обследуемой популяции. Приведенные выше значения являются ориентировочными и могут отличаться от опубликованных данных.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Точность и воспроизводимость

Внутри серии (n= 19)	Концентрация фолиевой кислоты, мкг/л	CV, %
Образец 1	12.69	4.70
Между сериями (n = 5)		
Образец 1	12.24	5.68

Восстановление

Образцы 4 пациентов разводились в разной степени, насыщались фолиевой кислотой и анализировались. Полученные средние данные приведены в таблицах в оригинале инструкции, стр. 23.

Линейность

Образцы 2 пациентов разводились и анализировались. Полученные результаты – см. таблицу в оригинале инструкции, стр. 24.

13. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ И НАБОРУ

- Данный набор произведен и поставляется согласно руководству IVD 98/79/ЕС.
- Реагенты, поставляемые в наборе, содержат органические растворители. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми оболочками.
- Все реагенты набора предназначены только для диагностики *in vitro*.
- Не используйте реагенты по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- Не используйте или не смешивайте реагенты различных лотов

или других источников.

- Необходимо соблюдать рекомендации по работе медицинских лабораторий.
- Время инкубации, температура инкубации и пипетируемые объемы различных компонентов установлены производителем. Любые отклонения от процедуры анализа, описанной в данной инструкции, не согласованные с производителем, могут повлиять на результаты тестирования. Производитель не несет ответственности за какой-либо ущерб, причиненный в случае неправильного использования набора.



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
www.diameb.com