

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ВІТАМІНУ В12 В ЛЮДСЬКІЙ СИРОВАТЦІ

3125-15, Vitamin B12 ELISA

Каталог. №: 3125-15

Методика від 05-10-2015

Кількість : 96

Виробник : DAI (США)



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

Аналіз	Vitamin B12 ELISA
Метод	Імуноферментний аналіз з затримкою
Принцип	Конкурентний ІФА з затримкою
Зразок	50 мкл сироватки або плазми
Загальний час	~ 95 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців
Чутливість	70.13 пг/мл

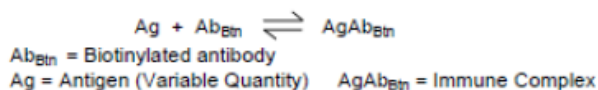
ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір DAI Vitamin B12 ELISA є ферментним імуноаналізом для кількісного визначення концентрацій Вітаміну В12 в сироватці людини. Цей набір призначений тільки для діагностичного використання in-Vitro.

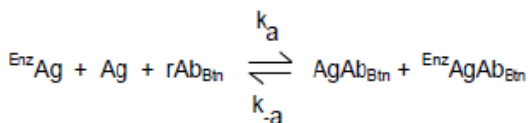
РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Конкурентний імуноферментний аналіз затримки (тип 9): Необхідні реагенти для імуноферментного аналізу включають антитіло, кон'югат фермент-антиген і нативний антиген. При змішуванні біотинильованого антитіла з сироваткою, що містить антиген, відбувається реакція між антигеном і антитілом. Взаємодія описується таким рівнянням:



Після короткої інкубації додається кон'югат (Ця додавання з затримкою дозволяє і збільшує чутливість для зразків з низькою концентрацією). Після додавання ферментного кон'югату, реакція конкуренції між ферментним аналогом і антигеном у зразку призводить до обмеженого числа зв'язуючи сайтів антитіл (не поглинулись в першій інкубації).



$Enz Ag$ = Кон'югат фермент-антиген (постійна величина)

$Enz Ag Ab_{B_{12}}$ = Ферментний кон'югат антиген-антитіло

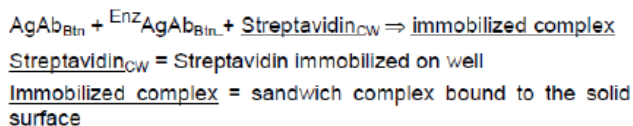
$rAb_{B_{12}}$ = Біотинильоване антитіло, яке не відреагувало в першій інкубації

K_a = Постійна асоціації

K_{-a} = Постійна дисоціації

$K = K_a/K_{-a}$ = Константа рівноваги

Відбувається одночасна реакція між біотином, приєднаним до антитіла, і стрептавідином, іммобілізованим на лунках. Це впливає на поділ фракції пов'язаних антитіл після декантування або аспірації.



Ферментна активність у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи відомі концентрації антигену декілька різних сироваток, можна побудувати криву, з якої визначаються концентрації невідомих антигенів.

МАТЕРІАЛИ І ПРИСТРОЇ

Матеріали, що поставляються в наборі

- Калібратори Вітаміну В-12 – 1 мл/флакон**
Шість (6) флаконів Контролів людського сироваткового альбуміну на вітаміні В-12 в концентраціях 0 (А), 100 (В), 200 (С), 400 (D), 1000 (Е) і 2000 (F) у пг/мл. Зберігати при 2-8 °С. 3 консервантом. Калібратори можуть бути виражені у молярних концентраціях (пМ/л) шляхом множення на 0.738. Наприклад: 100 пг/мл x 0.738 = 73.8 пМ/л.
- Ферментний реагент Вітаміну В-12 – 7 мл/флакон**
Один (1) флакон з Вітаміном В-12 (Аналог) – Кон'югат пероксидази хрому (HRP) в протеїн-стабілізуючій матриці. Зберігати при 2-8 °С.
- Біотинильований реагент Вітаміну В-12 – 7 мл/флакон**
Один (1) флакон реагенту містить кон'югат біотинильованого очищеного антивітаміну В-12 IgG кролика в буфері, синій барвник і консервант. Зберігати при 2 - 8 °С.
- Пластину, покрита Стрептавідином - 96 лунок**
Один 96-луноковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл стрептавідину, і упакований в алюмінієву оболонку з висушувачем. Зберігати при 2 - 8 °С.
- Концентрат Розчину для промивання - 20 мл/флакон**
Один (1) флакон містить поверхнево-активну речовину в буферному розчині. Консервант. Зберігати при 2 - 8 °С.
- Реагент субстрату - 12 мл/флакон**
Одна (1) пляшка містить Тетраметилбензидин (ТМВ) і перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2 - 8 °С.
- Стоп-розчин 8 мл/флакон**
Один (1) флакон містить сильну кислоту (H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-30 °С.
- Вивільняючий агент – 14 мл/флакон**
Один (1) флакон містить сильну основу (гідроксид натрію) і ціанистий калій.
- Стабілізуючий агент – 0.7 мл/флакон**
Один (1) флакон містить Розчин дитиотреїтолу (ДТТ).
- Нейтралізуючий Буфер - 7 мл/флакон**
Один (1) флакон містить буфер, який знижує рН екстракції зразка.
- Вкладиш інструкції**

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Примітка 2: Уникати тривалого впливу тепла і світла. **Відкриті реагенти стабільні протягом 60 (шістдесят) днів при зберіганні при 2-8 °С. Стабільність набору і компонентів позначені на етикетці.**

Примітка 3: Реагенти призначені для одного 96 – лунокового планшета.

Необхідні, але не надані матеріали

- Піпетки, здатністю внесення 50 мкл і 100 мкл з точністю краще, ніж 1.5%.
- Диспенсер(и) для багаторазового внесення обсягів 0.100 мл і 0.350 мл з точністю більш ніж 1.5%.
- Диспенсер(и) для внесення регульованих об'ємів (200-1000 мкл) кон'югату.
- Скляні пробірки для контрольної сироватки, контролю та підготовки зразка пацієнта.
- Мікропланшетний вошер або пластикова бутиль (опційно).
- Зчитувач мікропланшетів з довжиною хвилі 450 і 620 нм.
- Абсорбуючий папір для декантування лунок мікропланшетів.
- Пластикова плівка або кришка для мікропланшета для проведення інкубації.
- Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання.
- Таймер.
- Матеріали Контролю якості.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Буфер для промивання**
Розвести вміст розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою в підходящому для зберігання контейнері. Розведений буфер можна зберігати при кімнатній температурі (2-30 °С) на протязі до 60 днів.
- Екстракційний агент**
Додати аліквоту стабілізуючого агента для того, щоб підготувати 1/40 (стабілізуючий Агент/вивільняючий агент) розведеного розчину. Наприклад, щоб зробити 4000 мкл (4 мл) додати 100 мкл стабілізуючого агента до 3900 мкл вивільняючого агента.
- Екстракція зразка**
Підготувати необхідну кількість пробірок для підготовки всіх зразків пацієнтів, контролів і сироваток. Внести по 0.10 мл (100 мкл) кожного зразка в окрему тестову пробірку. Піпетувати 0.050 мл (50 мкл) підготовленого вивільняючого агента в кожну

тестову пробірку, помішуючи після кожного додавання. Залишити на 15 хвилин. В кінці 15 хвилин додати 0.050 мл (50 мкл) нейтралізуючого буфера, помішуючи після кожного додавання, щоб закінчити екстракцію.

Примітка 1: Не використовувати робочий субстрат, якщо він синього кольору.

Примітка 2: Чи не використовувати реагенти, які забруднені або мають зростання бактерій.

Примітка 3: Рекоменується використання вортекса з багаторазовим (3) внесенням.

Примітка 4: Дуже важливо вносити коректний об'єм з використанням калібрувальної піпетки і внесенням реагенту на дно пробірки під кутом, торкаючись стінки пробірки.

ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Зразками повинна бути кров; сироватка різних типів, забір яких проводився з дотриманням звичайних застережних заходів при зборі зразків крові з вени. Для точного порівняння при встановленні нормальних значень, необхідно взяти зразок ранішньої сироватки натще. Кров повинна бути зібрана в пробірку для забору крові з вени з червоним верхом (з або без додавання гелю) або з використанням для плазми вакуумної трубки, що містить гепарин. Для зразків сироватки дайте крові згорнутися. Центрифугувати зразок для відділення сироватки або плазми з клітин.
- Проби можуть зберігатися в холодильнику при 2-8 °C протягом не більше 5 (п'яти) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C протягом до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникати повторного заморожування і відтавання. При аналізі в дублікатах потребується 0.100 мл зразка.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед проведенням тесту привести всі реагенти, контролю і калібратори сироватки до кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим персоналом.**

1. Підготувати лунки мікропланшету для калібраторів, контролей і зразків пацієнтів для аналізу в дублікаті.
Помістіть невикористані смужки назад в алюмінієву упаковку, закрийте її і зберігайте при температурі 2-8 °C.
2. Піпетувати 0.050 мл (50 мкл) екстрагованого відповідним чином вітаміну B12 калібратора, контролю або взірця у відповідні лунки.
3. Додати 0.050 мл (50 мкл) Біотинильованого реагенту Вітаміну B-12 в усі лунки.
4. Обережно потрясти планшет протягом 20-30 секунд для ретельного змішування.
5. Накрити кришкою і витримати протягом 45 хвилин при кімнатній температурі.
6. Додати 0.050 мл (50 мкл) Ферментного реагенту Вітаміну B12 в усі лунки.
Додати безпосередньо зверху на реагент, розподілений в лунках.
7. Обережно потрясти планшет протягом 20-30 секунд для ретельного змішування.
8. Накрити кришкою і витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
9. Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. При декантуванні промокніть планшет абсорбуючим папером.
10. Додати 350 мкл розчину для промивання (див. розділ про підготовку реагентів), декантувати або аспірувати. Повторити два (2) рази, щоб в цілому було три (3) промивання. **Можна використовувати автоматичний або ручний пристрій для промивання. Дотримуйтесь інструкції виробника щодо експлуатації. Якщо використовується диспенсерна пляшка, наповніть кожну лунку стисненням пляшки (уникайте повітряних бульбашок) для промивки. Декантувати промивний розчин і повторити два (2) рази.**
11. Додати 0.100 мл (100 мкл) субстрату реагенту в усі лунки. Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінність реакції між лунками.
НЕ ТРЯСТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ.
12. Інкубувати при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
13. Додати 0.050 мл (50 мкл) стоп розчину в кожну лунку і обережно перемішати протягом 15–20 секунд. **Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінності в часі реакції між лунками.**
14. Зчитати абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (використовуючи контрольну довжину хвилі 620-630 нм). **Вимірювання повинно проводитися протягом п'ятнадцяти (15) хвилин після зупинки реакції.**

Примітка: Розвести зразки з концентраціями вище 2000 пг/мл 1:5 і 1:10 з Вітаміном B12 "0" пг/мл калібратором і повторно проаналізувати.

Проведення тесту

1. Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для досягнення відтворюваних результатів.
2. Піпетування проб не повинно займати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один (1) планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання розчину субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат і стоп-розчин мають додаватися в тій же послідовності, щоб усунути будь-які тимчасові відхилення в ході реакції.
6. Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунок.
7. Недотримання етапу видалення розчину аспірацією або декантуванням може призвести до неточних результатів.
8. Використовуйте компоненти з тієї ж партії. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Точне піпетування, а також дотримання часових проміжків і температурних вимог є суттєвими. Будь-яке відхилення від вказаних інструкцій може привести до неточних результатів.
10. Всі діючі національні стандарти, правила і закони, в тому числі, але не обмежуючись, хороші лабораторні процедури, повинні строго дотримуватися для забезпечення дотримання та правильного використання пристрою.
11. Важливо калібрувати все обладнання, наприклад, Піпетки, читачі, вошери та/або автоматизовані інструменти, які використовуються, і виконувати рутинне профілактичне обслуговування.

Інтерпретація

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні виконуватися кваліфікованим персоналом.
2. Лабораторні результати самі по собі є тільки одним аспектом для визначення догляду за хворими та не повинні бути єдиною основою для терапії, особливо якщо результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Для коректних результатів випробувань, адекватні значення контролей та інші параметри повинні бути в межах зазначеного діапазону.
4. Якщо тести змінені, наприклад, шляхом змішування складових з різних наборів, що може призвести до неправдивих результатів тесту, або якщо результати неправильно інтерпретовані, **DAI не несе ніякої відповідальності.**
5. Якщо використовуються комп'ютерні програми для інтерпретації результатів тесту, вкрай важливо, щоб прогнозовані значення калібраторів опинилися в межах 10% відповідних концентрацій.

РЕЗУЛЬТАТИ

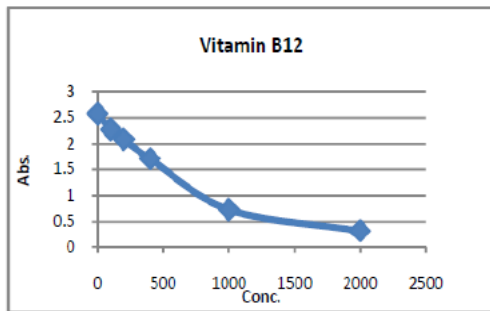
Калібрувальну криву використовують для отримання концентрацій вітаміну B12 в невідомих зразках.

1. Запишіть абсорбцію, отриману з роздруківки мікропланшетного рідера, як описано в прикладі 1.
2. Позначте точками абсорбцію кожного з дублікатів стандартної сироватки проти відповідної концентрації Вітаміну B12 в пг/мл на міліметровому папері (не вираховувати середнє значення дублікатів стандартів сироватки перед відкладанням на кривій).
3. З'єднати точки в найбільш підходящу криву.
4. Для визначення концентрацій вітаміну B12 для невідомих зразків відмітьте середню абсорбцію дублікатів кожного невідомого зразка на вертикальній вісі, знайдіть точку перетину з вертикальною віссю графіка, знайдіть точку перетину кривої і концентрації (в пг/мл) з горизонтальною віссю (дублікати невідомих зразків можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі, середня щільність (1.53) перетинає криву при концентрації вітаміну B12 (391.4 пг/мл) (див. Малюнок 1).

Примітка: Програмне забезпечення для аналізу ELISA також може бути використано для обробки даних. **Якщо таке програмне забезпечення використовується, необхідно забезпечити його перевірку.**

Таблицю дивись в оригіналі інструкції.

*Наведені вище дані і таблиця нижче призначені тільки для прикладу. Не використовуйте їх для розрахунку Ваших результатів.



Примітка: помножити горизонтальні значення на 0.738 для конверсії в пМ/мл.

ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними, наступні критерії повинні бути виконані:

1. Абсорбція (OD) калібратора 0 в пг/мл повинна бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні знаходитися у встановленому діапазоні.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

➤ Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю в низькому, нормальному і високому діапазонах для моніторингу проведення аналізу. Ці Контролі повинні розглядатися як невідомі зразки і значення повинні визначатися в кожній процедурі тесту. Дані Контролю якості повинні зберігатися для подальшої перевірки реагентів, що поставляються. Відповідні статистичні методи варто використовувати для з'ясування тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити власні межі аналізу. Крім того, максимальне поглинання має узгоджуватися з попередніми даними. Значне відхилення від показників вказує на непомічену зміну в умовах проведення аналізу або деградацію реагентів в наборі. Свіжі реагенти повинні бути використані, щоб визначити причину відхилень.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для "нормального" населення очікувані діапазони для даного набору докладно представлені в таблиці 1.

Таблиця 1
Очікувані значення для ELISA Vitamin B12

Населення	пг/мл	пмоль/л
Новонароджені	160-1300	118-959
Дорослі	200-835	148-616
Дорослі > 60 років	110-800	81-590

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можуть бути визначені даним методом для "нормального" населення, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках аналітика. З цієї причини кожна лабораторія повинна використовувати діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки не буде встановлено власний діапазон шляхом аналізів взірців людей, характерних для району, в якому розташована лабораторія.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність системи аналізу DAI Вітамін В12 в аналізі і між аналізами оцінювалася за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольної сироватки. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення і коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3.

Таблиця 2
Точність в аналізі (пг/мл)

Взірець	n	X	σ	CV, %
Низький	20	334.8	24.3	7.3
Нормальний	20	484.9	17.6	3.6
Високий	20	925.3	28.3	3.1

Таблиця 3
Точність між аналізами (пг/мл)

Взірець	n	X	σ	CV, %
Низький	18	314.9	49.4	15.7
Нормальний	18	441.3	46.7	10.6
Високий	18	913.1	39.4	4.8

*Дані отримані в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

Чутливість

Даний аналіз має чутливість 70.13 пг/мл. Чутливість була отримана визначенням варіабельності 0 калібратора в пг/мл з використанням 2 2σ (95% точність) для розрахунку мінімальної дози.

Достовірність

Даний аналіз порівнювався з методом хемілюмінесцентного імуноаналізу. Використовувались біологічні зразки з низькими, нормальними і відносно високими рівнями вітаміну В12 (значення варіювали від 156 пг/мл до 1830 пг/мл). Загальна кількість таких зразків становила 56. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції були розраховані для цього аналізу порівняно із звичайним методом. Отримані дані представлені в таблиці 4.

Метод	Середнє значення (x)	Аналіз регресії найменших квадратів	Коефіцієнт кореляції
Даний метод (Y)	654.3	$Y=1.0186x-48.82$	0.9506
Референтний (X)	690.2		

Тільки незначна кількість зміщення між цим методом і стандартним методом зазначено через близькість середніх значень. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

Специфічність

Перехресна реактивність в % антитіл Вітаміну В12 на обрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перехресну реактивність було розраховано шляхом отримання співвідношення між дозою додаткової речовини і дозою вітаміну В12, необхідних для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

Substance	Cross Reactivity
Bilirubin	0.0003
Rheumatoid Factor	0.0008
Cobinamide	<0.0001
Lipemia	<0.0001
Hemoglobin	<0.0001

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. Для діагностичного використання in vitro.
 2. Не для Зовнішнього або Внутрішнього використання на людях або тваринах.
- Було виявлено, що реагенти, які містять сироватку крові людини, були нереактивними на Поверхневий антиген гепатиту В, ВІЛ-1 і 2 та HCV. Оскільки жоден тест не може дати повної гарантії того, що інфекційні агенти відсутні, всю людську сироватку слід вважати потенційно небезпечною і здатною передавати захворювання.
- **Безпечна утилізація компонентів набору повинна відбуватись у відповідності з місцевими нормативними та законодавчими вимогами.**



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