

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЦЕПТОРА РОЗЧИННОГО ТРАНСФЕРИНУ (sTfR) В ЛЮДСЬКІЙ СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ

### 3126-15, sTfR ELISA

Каталог. №: 3126-15

Методика від 04-08-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

Аналіз	(sTfR) Soluble Transferrin Receptor ELISA
Метод	Імуноферментний аналіз
Принцип	Кількісний
Зразок	10 мкл
Загальний час	~ 90 хвилин
Термін придатності	24 місяці
Чутливість	0.055 нмоль/л

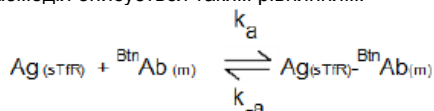
#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір DAI є імуноферментним аналізом для кількісного визначення концентрації sTfR в людській сироватці або плазмі.

#### РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції).

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Необхідні реагенти для імуноферментного аналізу включають антитіла високої спорідненості і специфічності (ферментні та іммобілізовані), з різним і чітким розпізнаванням епітопу, в надлишку, і нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час тесту на поверхні лунки мікропланшета при взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунки, і екзогенно доданих біотинильованих моноклональних анти-sTfR антитіл. При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл і сироватки, яка містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілом, формуючи комплекс антиген-антитіло. Взаємодія описується таким рівнянням:



B<sub>tn</sub> Ab (m) = Біотинильоване моноклональне антитіло (надмірна кількість).

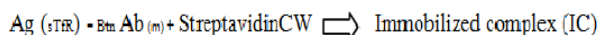
AgI (sTfR) = Нативний антиген (змінна величина).

Ag (sTfR) - B<sub>tn</sub> Ab (m) = Комплекс антиген-антитіло (змінна величина).

K<sub>a</sub> = Постійна Асоціації.

K<sub>-a</sub> = Постійна дисоціації.

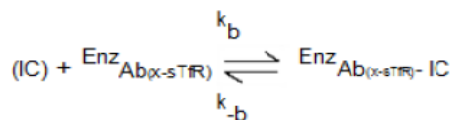
Одночасно комплекс осідає в лунці завдяки реакції високої спорідненості між стрептавідином і біотинильованим антитілом. Ця реакція показана нижче:



Стрептавідин CW = Стрептавідин, іммобілізований в лунках.

Іммобілізований комплекс (IC) = Ag-Ab, пов'язані з лункою

Після відповідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антитіло-антиген відділяється від незв'язаного антигену за допомогою декантування або аспірації. Додається інше антитіло (направлено на інший епітоп), мічене ферментом. Інша взаємодія відбувається з утворенням комплексу антитіло-антиген-біотинильоване антитіло, міченого ферментом, на поверхні лунки. Надлишок ферменту вимивається під час промивки. Відповідний субстрат додається для одержання забарвлення, яке вимірюється з використанням мікропланшетного спектрофотометра. Активність ферменту в лунці прямо пропорційна концентрації нативного вільного антигену. Використовуючи декілька різних сироваток з відомою концентрацією антигену, може бути побудована калібрувальна крива, з якої визначається концентрація антигену невідомих зразків.



EnzAb (x-sTfR) = Мічене ферментом антитіло (надмірна кількість)

EnzAb (x-sTfR) - IC = Комплекс антиген-антитіло

K<sub>b</sub> = Постійна асоціації.

K<sub>-b</sub> = Постійна дисоціації.

#### ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками повинна бути кров, сироватка або гепаринизована плазма 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 пробірці для забору крові з вени з червоним верхом (з або без добавлення 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 0.050 мл зразка.

#### МАТЕРІАЛИ І ПРИСТРОЇ

##### Матеріали, що поставляються в наборі

- Калібратори sTfR – 0.5 мл/флакон**  
Шість (6) флаконів Контролей для sTfR в концентраціях 0 (A), 3.0 (B), 10 (C), 20 (D), 40 (E) і 80 (F) у нмоль/л. Зберігати при 2 - 8 °C. 3 консервантом.
- Ферментні реагенти sTfR – 12.0 мл/флакон**  
Один (1) флакон з sTfR (Аналог) – Кон'югат пероксидази хрому (HRP) в протеїн-стабілізуючому матриці. Зберігати при 2-8 °C.
- Біотинильований реагент sTfR – 12.0 мл/флакон**  
Один (1) флакон реагенту містить кон'югат біотинильованого очищеного анти-sTfR IgG кролика в буфері, синій барвник і консервант. Зберігати при 2 - 8 °C.
- Пластина, покрита Стрептавідином - 96 лунок**  
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл стрептавідину, і упакований в алюмінієву оболонку з висушувачем. Зберігати при 2 - 8 °C.
- Концентрат Розчину для промивання - 20 мл/флакон**  
Один (1) флакон містить поверхнево-активну речовину в буферному розчині. Консервант. Зберігати при 2 - 30 °C.
- Розчин субстрату - 12 мл/флакон**  
Одна (1) пляшка містить Тетраметилбензидин (ТМВ) і перекис водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в буфері. Зберігати при 2 - 8 °C.
- Стоп-розчин 8 мл/флакон**  
Один (1) флакон містить сильну кислоту (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при температурі 2-30 °C.
- 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 °C. Стабільність набору і компонентів позначені на етикетці.**

**Примітка 3:** Реагенти призначені для одного 96 – лункового планшета.

##### Необхідні, але не надані матеріали

- Піпетки, здатністю внесення 10 мкл і 100 мкл з точністю краще, ніж 1.5%.
- 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.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

##### 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 ( 20-27 °C) на протязі до 60 днів.

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

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

#### Робочі кроки

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 0.010 мл (10 мкл) відповідного калібратора, контролю або зрізця в підготовлені лунки.
3. Додати 0.100 мл (100 мкл) Біотинильованого реагенту sTfR 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. Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. При декантуванні промокніть планшет абсорбуючим папером.
7. 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.**
8. Додати 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту анти-sTfR в усі лунки.
9. Накрити кришкою і витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
10. Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. При декантуванні промокніть планшет абсорбуючим папером.
11. Додати 350 мкл розчину для промивання (див. розділ про підготовку реагентів), декантувати або аспірувати.
12. 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.**
13. 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.**
14. Інкубувати при кімнатній температурі протягом п'ятнадцяти (15) хвилин.
15. 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.
16. Читати абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (використовуючи контрольну довжину хвилі 620-630 нм). **Вимірювання повинно проводитися протягом тридцяти (30) хвилин після зупинки реакції.**

**Примітка:** Розвести зразки з концентраціями вище 80 нмоль/мл з "0" нмоль/мл калібратором і помножити результат на коефіцієнт розведення.

#### РЕЗУЛЬТАТИ

Калібрувальну криву використовують для отримання концентрацій sTfR 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 sTfR в нмоль/л 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 sTfR 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 нмоль/л) з горизонтальною віссю (дублікати невідомих зразків можуть бути усереднені, як зазначено). У

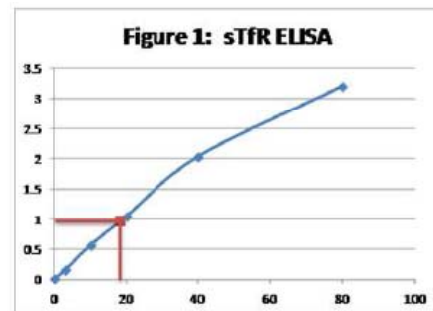
наступному прикладі, середня щільність (0.978) перетинає криву при концентрації sTfR (18 нмоль/л) (див. Малюнок 1).

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

Приклад 1

Sample I.D.	Well Number	Abs (A)	Mean Abs (B)	Value
Cal A	A1	0.012	0.013	0.0
	B1	0.013		
Cal B	C1	0.156	0.156	3.0
	D1	0.157		
Cal C	E1	0.579	0.567	10.0
	F1	0.555		
Cal D	G1	1.075	1.048	20.0
	H1	1.021		
Cal C	A2	2.069	2.032	40.0
	B2	1.995		
Cal F	C2	3.240	3.204	80.0
	D2	3.168		
Pat # 1	E3	0.958	0.978	18.0
	F3	0.998		

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



#### Параметри контролю якості

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

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

#### Аналіз ризику

Форма паспорта безпеки та аналіз ризиків для даного продукту доступні за запитом DAL.

#### 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.**

- 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.
- Для коректних результатів випробувань, адекватні значення контролей та інші параметри повинні бути в межах зазначеного діапазону.
- 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.
- Якщо використовуються комп'ютерні програми для інтерпретації результатів тесту, вкрай важливо, щоб прогнозовані значення калібраторів опинялися в межах 10% відповідних концентрацій.

#### 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 sTfR**

1.8 – 4.6 мг/л	25.13 – 64.22 нмоль/л
<b>Конверсія між мг/л та нмоль/л</b>	
(нмоль/л) / 13.96 = (мг/л)	(мг/л) x 13.96 = (нмоль/л)

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 sTfR 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 (нмоль/л)**

Взірець	n	X	SD	CV, %
Низький	20	10.67	0.62	5.8
Нормальний	20	21.25	0.93	4.4
Високий	20	34.54	1.40	4.1

**Таблиця 3**  
**Точність між аналізами (нмоль/л)**

Взірець	n	X	SD	CV, %
Низький	5	11.19	0.85	7.6
Нормальний	5	22.07	2.25	10.2
Високий	5	32.47	2.03	6.3

##### Чутливість

Даний аналіз має чутливість 0.055 нмоль/л. Чутливість була отримана визначенням варіабельності 0 калібатора в пг/мл з використанням  $2\sigma$  (95% точність) для розрахунку мінімальної дози.

##### Специфічність

Перехресна реактивність в % антитіл sTfR 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 sTfR, необхідних для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

Table 4	
Substance	Cross Reactivity
Human Diferritransferrin	ND
Human Apotransferrin	ND
Human Heart Ferritin	ND
Human Spleen Ferritin	ND
Triolein	ND
Human Serum Albumin	ND
Bilirubin	ND
Hemoglobin	ND

#### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контрольні 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 відхилення.

#### ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

- Для діагностичного використання in vitro.
- 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)