

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ D

25(OH) Vitamin D (Vit D) Test System

Кат. №: 7725-300A

Дата випуску інструкції: 16-01-2015
Версія 0



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

1.0 ВСТУП

Призначення: Кількісне визначення концентрації 25-ОН Вітаміну D в людській сироватці або плазмі за допомогою ІФА, Колориметричний.

2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. Оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Набір являє собою твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), заснований на принципі конкурентного зв'язування. Антитіла анти-Вітаміну D нанесені в лунки, інкубують зі стандартами Вітаміну D, контролюями, зразками і кон'югатом Вітамін D-біотин при кімнатній температурі протягом 90 хвилин. Під час інкубації фіксована кількість міченого біотином Вітаміну D конкурує з ендogenous Вітаміном D у зразку, стандарті або контрольній сироватці за фіксовану кількість ділянок зв'язування на антитілі до Вітаміну D. Після етапу промивання, зв'язаний вітамін D-біотин виявляється за допомогою Стрептавідин-HRP (SA-HRP). Кон'югат SA-HRP, імунологічно пов'язаний з лункою, поступово зменшується по мірі збільшення концентрації вітаміну D у зразку. Незв'язаний кон'югат SA-HRP потім видаляють і лунки промивають. Далі додають розчин ТМБ-реагенту і інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, в результаті чого розвивається синій колір. Розвиток кольору припиняють додаванням стоп-розчину, і вимірюють поглинання спектрофотометрично при 450 нм. Стандартну криву отримують, будуючи графік концентрації стандарту проти абсорбції. Інтенсивність кольору буде обернено пропорційна кількості 25-ОН вітаміну D у зразку. Аналіз вимірює як 25-ОН вітамін D₂, так і D₃. Загальна тривалість процедури аналізу становить 2,5 години.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Вітаміну D - 0.5 мл/флакон - [1-7]

7 флаконів референсних калібраторів для 25(OH) Вітаміну D з приблизними* концентраціями 0 (1), 2.5 (2), 5.0 (3), 15 (4), 35 (5), 70 (6) та 150 (7) нг/мл. Зберігати захищеними від світла при 2-8 °C.

*Точні концентрації зазначені на етикетках для кожного лоту.

Примітка: Щоб перетворити в нмоль/л, помножте результати на 2.5.
Приклад 10 нг/мл = 25 нмоль/л

B. Контролі Вітаміну D - 0.5 мл/флакон - [1-2]

Два (2) флакони для 25(OH) Вітаміну D з приблизними концентраціями (точне значення зазначене на етикетці).

C. Біотинильований 25(OH) Вітамін D реагент (51X) - 0.5 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить кон'югат 25 (OH) вітамін D-біотин в 51X концентрованому розчині. Див. Розділ 8.0 "Підготовка реагенту". Зберігати в захищеному від світла місці при температурі 2-8 °C.

D. Розчинник для аналізу - 24 мл/флакон

Див. Розділ 8.0 "Підготовка реагенту". Зберігати в захищеному від світла місці при температурі 2-8 °C.

E. Стрептавідин-HRP - 23 мл/флакон

Зберігати в захищеному від світла місці при температурі 2-8 °C.

F. Планшет з нанесеними антитілами Вітаміну D - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антивітаміном D. Зберігати захищеним від світла при 2-8 °C.

G. Концентрат Промивного розчину (20X) - 25 мл/флакон

Див. Розділ 8.0 "Підготовка реагенту". Зберігати при температурі 2-8 °C.

H. Субстрат ТМБ - 24 мл/флакон

Один (1) флакон з тетраметилбензидином (ТМБ) у буфері. Зберігати при 2-8 °C.

I. Стоп-розчин - 12 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

J. Ущільнювальна плівка для мікропланшета - 2 штуки

K. Інструкція до набору.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Не піддавати впливу тепла та сонця. Стабільність компонентів та набору зазначені на етикетці.

Зауваження 3: Перераховані реагенти для одного 96-луноквого мікропланшета.

4.1 Необхідні, але не надані з набором матеріали

1. Піпетки, здатні вносити об'єми 0,050 & 0,100 мл (50 & 100 мкл) з точністю, що перевищує 1,5%.
2. Дозатор (и) для повторного внесення об'ємом 0,100 і 0,300 мл (100 & 300 мкл) з точністю, що перевищує 1,5% (опційно).
3. Мікропланшетний вошер або бутель, що стискається.
4. Мікропланшетний рідер з фільтром на 450 нм.
5. Вортексний змішувач з плоскою головкою.
6. Шейкер.
7. Абсорбуючий папір для промокання мікропланшетних лунок.
8. Вакуумний аспіратор (додатково) для стадій промивання.
9. Таймер.
10. Контейнер для зберігання промивного буфера.
11. Дистильована або деіонізована вода.
12. Матеріали контролю якості.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать сироватка, гепаринізована плазма або ЕДТА плазма за типом, і необхідно дотримуватися звичайних заходів безпеки при зборі зразків венепункцією. Для точного порівняння з встановленими нормальними величинами слід отримати зразки сироватки натщесерце. Кров слід збирати в пробірці з червоним верхом Redtop без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) або для плазми використовувати вакуумні трубки, що містять ЕДТА або гепарин. Дайте крові згорнутися для зразків сироватки. Центрифугувати зразки, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, то вони можуть зберігатися при температурі -20 °C протягом до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування і відтавання. При аналізі в дублікатах необхідно 50 мкл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю в низькому, середньому та високому діапазоні значень для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Буфер для промивок

Розбавте концентрат розчину для промивання до 500 мл дистильованою або деіонізованою водою (25мл, 20X – 475 мл, вода) у відповідному контейнері для зберігання. Зберігати при кімнатній температурі.

2. Робочий розчин біотину

Безпосередньо перед використанням готують 1X робочий розчин 1:51 з розчинниками для аналізу (наприклад, додають 0,1 мл 51X концентрату кон'югату вітамін D-біотин до 5 мл розчинника для

аналізу). Розчинник для аналізу, що залишився, повинен зберігатися при температурі 2-8 °C у темряві та щільно закритим.

Примітка 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він виглядає синім.

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедура тестування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом****

Після початку процедури всі кроки повинні бути завершені без перерви.

1. Виберіть необхідну кількість лунок для калібратора, контролю та зразка пацієнта для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
2. Додайте піпеткою по 10 мкл відповідних калібраторів, контролів та зразків у відповідні лунки.
3. Додайте 0.200 мл (200 мкл) Розчину Робочого Біотину в усі лунки.
4. Обережно змішайте вміст лунок протягом 20 секунд, з використанням шейкера при 200-400 об/хв (або еквівалентному русі). Вийміть з шейкера і накрийте пластину адгезивною плівкою, переконавшись, що кожна лунка повністю закрита.
5. Інкубуйте запечатану пластину протягом дев'яноста (90) хвилин при кімнатній температурі (20-27 °C).
6. Обережно зніміть плівку.
7. Видаліть вміст мікропланшета за допомогою декантації або аспірації. При декантації, постукайте і промокніть пластину насухо абсорбуючим папером.
8. Внесіть 0,300 мл (300 мкл) Промивного буфера (див. Розділ "Підготовка реагентів"), декантуйте або аспіруйте. Повторіть два (2) додаткові рази, в загальному три (3) промивання. Можна використовувати автоматичний або ручний промивний вошер. Дотримуйтесь інструкцій виробника, щоб правильно їх використовувати. Якщо використовується пляшка для промивання, заповніть кожну лунку, стискаючи пляшку (уникаючи утворення повітряних бульбашок). Декантуйте промивний розчин та повторіть два (2) додаткові рази.
9. Додайте по 0,200 мл (200 мкл) Ферментного реагенту (Стрептавідин-NRP) в кожну лунку.
10. Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
11. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
12. Внесіть 0,300 мл (300 мкл) Промивного буфера (див. Розділ "Підготовка реагентів"), декантуйте або аспіруйте. Повторіть два (2) додаткові рази, в загальному три (3) промивання. Можна використовувати автоматичний або ручний промивний вошер. Дотримуйтесь інструкцій виробника, щоб правильно їх використовувати. Якщо використовується пляшка для промивання, заповніть кожну лунку, стискаючи пляшку (уникаючи утворення повітряних бульбашок). Декантуйте промивний розчин та повторіть два (2) додаткові рази.
13. Додайте 0.200 мл (200 мкл) субстрату ТМБ до всіх лунок (за допомогою багатоканальної піпетки).
14. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (30) хвилин.
15. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 20-30 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
16. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм. Виміри повинні бути проведені протягом 10 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Вітаміну D в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

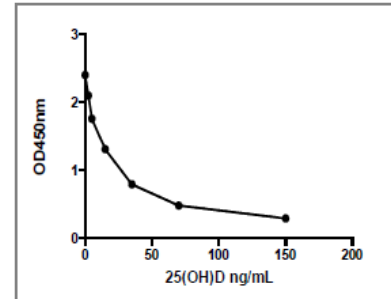
1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Вітаміну D в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Для визначення концентрації Вітаміну D в невідомих зразках знайти середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину з кривою і концентрацію (в нг/мл) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомих зразків можуть бути усереднені).

Приклад 1

ID зразка	Abs	Концентрація (нг/мл)
Калібратор 1	2.40	0
Калібратор 2	2.10	2.5
Калібратор 3	1.76	5
Калібратор 4	1.31	15
Калібратор 5	0.79	35
Калібратор 6	0.48	70
Калібратор 7	0.29	150

*Дані, таблиці та рисунки наведені тільки для прикладу. Не використовуйте їх для розрахунку результатів.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора 0 нг/мл ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS та Форма Аналізу Ризиків для даного продукту доступні за запитом від Monobind Inc.

12.1 Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим навченим професіоналом.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедури тестової системи були розроблені для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів. (Boscato LM Stuart MC "Гетерофільні

антитіла: проблема для всіх імунологічних досліджень" *Clin. Chem.* 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.

4. Для отримання дійсних результатів адекватній контролі та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

На підставі опублікованої літератури було визначено наступні діапазони.

Ці діапазони слід використовувати лише як керівництво:

РІВЕНЬ	ДІАПАЗОН (нг/мл)
Дефіцит	< 10
Недостатньо	10-30
Достатньо	30-100
Інтоксикація	> 100

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі

Сироватка	N	x	δ	C.V., %
1	16	8,1	0,315	3,87
2	16	25,3	1,608	6,36
3	16	35,9	1,661	4,62

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами

Сироватка	N	x	δ	C.V., %
1	10	7,9	0,36	4,55
2	10	23,4	1,63	6,95
3	10	37,6	2,02	5,38

14.2 Чутливість

Чутливість методу склала 0,67 нг/мл. Чутливість визначали, обчислюючи середнє плюс 2SD стандартної нульової точки, випробуваної 20 разів в тому ж режимі.



ВИРОБНИК

Монобайнд, Інс.
100 Норт-Плуент-Драйв
Лейк-Форест, Каліфорнія 92630
Тел: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

