

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДИГОКСИНУ МЕТОДОМ ІФА

Digoxin (DIG) Test System

Кат. №: 925-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 6



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

1.0 ПРЕДСТАВЛЕННЯ

Застосування за призначенням: Кількісне визначення концентрації Дигоксину в сироватці або плазмі людини за допомогою імуноферментного аналізу мікропланшетів, колориметричний.

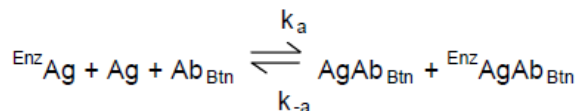
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (ТИП 7):

Необхідні для ІФА реагенти включають: антитіла, кон'югат фермент-антиген, нативний антиген.

При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається конкурентна реакція між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість зв'язуючи сайтів антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням - див. оригінал інструкції.



Ab_{Btn} = Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

AgAb_{Btn} = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = Комплекс кон'югат - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a / k_{-a}$ = константа рівноваги

Одночасно відбувається реакція між біотином, прикріпленим до антитіл, і стрептавідином, прикріпленим до мікролунок. Це дозволяє відділити зв'язану фракцію антитіл після декантації/аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ – іммобілізований комплекс

Стрептавідин_{CW} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Дигоксину - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсної сироватки для Дигоксину з концентраціями 0 (A), 0.25 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.0 (E) і 4.0 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

B. Ферментний реагент Дигоксину - 6 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон кон'югату Дигоксин-пероксидаза хрому (HRP), в буфері з барвником. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Біотиновий Реагент Дигоксину - 6 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон реагенту містить кон'югат анти-дигоксину та біотинильованої кролячої сироватки в буфері, з барвником та консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл (µg/ml) Стрептавідину і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат Розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат A - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Субстрат B - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатори, здатні подавати об'єми 0.025, 0.050 та 0.100 мл (мл) (25, 50 та 100 мкл (µl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (µl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (µl)) з точністю до 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений 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, ВГС 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, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитися у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров, сироватка по типу. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C)

на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. 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. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин - Стабільний протягом 1 року
Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедуру випробування повинен проводити кваліфікований фахівець або підготовлений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного референсного сироваткового калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) референсного сироваткового калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 50 мкл (µl) Ферментного реагенту Дигоксину у кожну лунку.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) Біотинового Реагенту Дигоксину в усі лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Накрити і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 4 нг/мл (ng/ml) внесіть 12.5 мкл (µl) зразка та 12.5 мкл (µl) «0» референсної сироватки в лунку для зразка. Помножьте значення зчитування на 2, щоб отримати концентрацію Дигоксину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Дигоксину в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Дигоксину в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Дигоксину в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.224 перетинає стандартну криву при 1.06 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

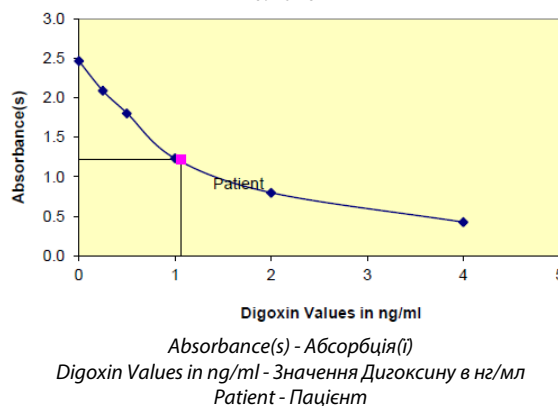
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	2.510	2.465	0
	B1	2.420		
Калібратор В	C1	2.107	2.088	0.25
	D1	2.070		
Калібратор С	E1	1.832	1.805	0.5
	F1	1.779		
Калібратор D	G1	1.262	1.232	1.00
	H1	1.202		
Калібратор E	A2	0.835	0.798	2.00
	B2	0.762		
Калібратор F	C2	0.434	0.425	4.00
	D2	0.415		
Пацієнт	E2	1.214	1.224	1.06
	F2	1.233		

*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «0» нг/мл (ng/ml) повинна бути ≥ 1.3
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Паспорт безпеки та форма аналізу ризику для цього продукту доступні на запит від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- 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.
- Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- 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.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур за використанням AccuBind® ІФА були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
- 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.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Деякі хворобливі стани, як відомо, підвищують сприйнятливості пацієнта до токсичності Дигоксину. Такі як гіпокаліємія, гіпотиреоз, ниркова недостатність, важка хвороба серця.
- Ряд дослідників повідомили про відносно високі рівні Дигоксину в сироватці крові у маленьких дітей. Тим не менш, діти старше двох років, які пройшли курс лікування Дигоксином, демонструють рівні Дигоксину в сироватці наближені до дорослих значень.
- Пацієнти, які отримують одночасно терапію хінідіном та Дигоксином, повинні обстежуватися ретельніше. Рівні сироватки Дигоксину можуть підвищуватися до більш ніж у два рази стабілізованого рівня протягом 24 годин після початку терапії Хінідіном і можуть залишатися високими протягом декількох днів.
- Пацієнти, які приймають сечогінний фуросемід, не можуть відображати значення Дигоксину, які відповідають клінічній картині. Коли препарати фуросеміду та наперстянки використовуються одночасно, моніторинг пацієнтів є бажаним.

- Пацієнтам на великих дозах добавок біотину слід припинити використання на один день до взяття крові для того, щоб усунути можливі перешкоди.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Звичайний терапевтичний діапазон Дигоксину у дорослих 0.5-2.0 нг/мл (ng/ml). Тим не менш, є випадки перевищення концентрації Дигоксину сироватки в групах пацієнтів з і без клінічної токсичності. Значна кількість нетоксичних пацієнтів має концентрації сироватки, які перевищують 2.0 нг/мл (ng/ml) і, відповідно, значна кількість токсичних пацієнтів мають значення в сироватці в межах від 1.4-2.0 нг/мл (ng/ml). Крім того, пацієнти з суправентрикулярною аритмією можуть потребувати більш високих доз для контролю частоти серцевих скорочень: концентрації Дигоксину цих пацієнтів в діапазоні від 2.0-4.0 нг/мл (ng/ml) без клінічної токсичності. З цих причин, лікар повинен зробити певний клінічний діагноз після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи DIG AccuBind® ІФА

Нормальні дорослі	0.5 - 2.0 нг/мл (ng/ml)
-------------------	-------------------------

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірених і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому знаходиться лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність Тест-системи Дигоксин AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів контрольних 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 (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	12	0.048	0.04	9.0
Нормальний	12	1.67	0.11	6.6
Високий	12	3.14	0.16	5.0

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами* (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	0.51	0.05	9.8
Нормальний	10	1.62	0.13	8.0
Високий	10	3.32	0.22	6.6

*Вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Тестова система Дигоксин AccuBind® ІФА має аналітичну чутливість 0.072 нг/мл (ng/ml). Чутливість визначали шляхом визначення мінливості «0» калібратора та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної концентрації.

14.3 Достовірність

Тест-систему Дигоксин AccuBind® ІФА порівнювали з затвердженим методом визначення Дигоксину. Були використані біологічні зразки від загального населення. Значення в діапазоні 0.5-2.917 нг/мл (ng/ml). Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	1.249	Y=0.9702 + 0.1384 (x)	0.9288
Метод порівняння	1.144		

Лише незначні величини зміщення між цим методом та референсним методом вказують на близькість середніх значень. Рівняння найменшої квадратичної регресії та коефіцієнт кореляції також свідчать про чудову узгодженість методу.

14.4 Специфічність

Перехресну реакційну здатність антитіла Дигоксину до вибраних речовин оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозами інтерферуючої речовини та дозою дигоксину, необхідного для витіснення тієї ж кількості індикатора.

Субстанція	Перехресна реактивність
Дигоксин	1.00
Ді-Ацетилдигоксин	1.00
β-Метилдигоксин	1.00
α-Ацетилдигоксин	1.00
Дигітоксин	0.019
Дигітоксигенін	0.017
Ланатозид А	0.016
Уабейн	0.001
Спіронолактон	0.001
Преднізон	0.001
Прегненолон	0.001
Дигітоксоза	0.001



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поїнт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
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
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

