

## НАБІР РЕАГЕНТІВ

### sVCAM-1 ELISA

#### sVCAM-1 ELISA

Каталог. №: **EIA-4873**  
Кількість: **96**

Дата випуску інструкції: **03-2019**  
Версія: **7.0**



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

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА sVCAM-1 – це ферментний імуноаналіз для кількісного визначення VCAM-1 людини.

**Даний набір призначений тільки для дослідження. Не можна використовувати для діагностичних та терапевтичних процедур.**

#### 2. РЕЗЮМЕ

Молекула адгезії судинних клітин-1 (VCAM-1) або CD106 є членом надсімейства гена імуноглобуліну. Початкове молекулярне клонування VCAM-1 повідомляло про шість позаклітинних Ig-подібних доменів (6D VCAM-1).

Цей 6D VCAM-1 виникає через альтернативний сплайсинг із семидоменного VCAM-1 (7D VCAM-1). 7D VCAM-1 є домінуючою формою, що виражена культивованими ендотеліальними клітинами людини. Домен 1 - 3 є дуже гомологічними до домену 4 - 6, і це говорить про те, що вони виникли шляхом дублювання генів. Комплементарна ДНК 7D VCAM-1 прогнозує основний білок приблизно 81 кДа з семи потенційних N-зв'язаних ділянок глікозилювання. Після повного глікозилювання зрілий білок має молекулярну масу приблизно 102 кДа. Це спостереження загалом узгоджується з дослідженнями імунопреципітації, які показують протеїн приблизно 110 кДа на ендотелій, активований цитокінами.

Мишачий та щурячий VCAM-1 був клонований. На відміну від ICAM-1, VCAM-1 дуже зберігся завдяки еволюції. Як мишачий, так і щурячий VCAM-1, є високо гомологічним на рівні білка до людського VCAM-1 (77% та 76% відповідно). VCAM-1 підтримує адгезію лімфоцитів, моноцитів, природних клітин-убивць, еозинофілів та базофілів завдяки взаємодії з лейкоцитним дуже пізнім антигеном-4 (VLA-4). Взаємодія VCAM-1 / VLA-4 опосередковує тверду прихильність циркулюючих не нейтрофільних лейкоцитів до ендотелію. VCAM-1, також, бере участь у адгезії лейкоцитів за межами судинної оболонки, опосередковуючи адгезію лімфоцитів-попередників до стромальних клітин кісткового мозку та зв'язування В-клітин з фолікулярними клітинами дендриту лімфатичного вузла.

VCAM-1 не експресується конститутивно на ендотелій, але може бути регульований *in vitro* у відповідь на LPS, TNF- $\alpha$  та IL-1, а також на інтерферон- $\gamma$  та IL-4.

VCAM-1, також, присутній у тканинних макрофагах, дендритних клітинах, фібробластах кісткового мозку, міобластах та міотрубках.

Було описано розчинну форму VCAM-1 (sVCAM-1). Розчинні рівні VCAM-1 були виявлені у сироватці крові здорових людей, а підвищені рівні sVCAM-1 можна виявити при таких захворюваннях:

**Рак:** яєчників, шлунково-кишкового тракту, нирок, рак сечового міхура, негоджкінська лімфома, рак молочної залози (кіста);

**Автоімунні захворювання:** розсіяний склероз (цереброспінальна рідина), системний склероз, системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит;

**Інфекції:** сепсис, менінгіт, малярія;

**Запалення:** васкуліт, алкогольний цироз, первинний біліарний цироз, гранульоматоз Вегенера;

**Інше:** порушення функції нирок, гемодіаліз, гіпертиреоз, нирковий алотрансплантат.

Для оновлення літератури заходити на [drg@drq-diagnostics.de](http://drg@drq-diagnostics.de).

#### 3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Покрите антитіло проти-людського VCAM-1 абсорбується на мікролунках. Людський VCAM-1, присутній у зразку або стандарті, зв'язується з антитілами, абсорбованими на мікролунках. Додають суміш кон'югатів (антитіло проти вірусу VCAM-1, кон'юговане з біотином, та Стрептавідином-HRP).

Антитіло, кон'юговане з біотином, до людського VCAM-1 зв'язується з людським VCAM-1, захопленим першим антитілом.

Стрептавідин-HRP зв'язується з біотин-кон'югованим антитілом до людського VCAM-1.

Після інкубації, не зв'язаний Стрептавідин-HRP, видаляється під час етапу промивання, а в лунки додають розчин субстрату, реактивний з HRP.

Перекладач Романюк Н.П.

Кольоровий продукт утворюється пропорційно до кількості людського VCAM-1, присутнього у зразку чи стандарті. Реакцію зупиняють додаванням кислоти і вимірюють поглинання при 450 нм. Стандартну криву готують із 6 стандартних розведень VCAM-1 людини та визначають концентрацію зразка VCAM-1 людини.

#### 4. РЕАГЕНТИ, ЯКІ НАДАЮТЬСЯ

1 - алюмінієвий пакет з **мікролунковим планшетом, покритим** моноклональним антитілом до людського VCAM-1

1 - флакон (100 мкл) **Суміші кон'югату**, що містить Біотин-Кон'югат до моноклонального антитіла до людського VCAM-1 змішане зі Стрептавідином-HRP.

2 – флакони ліофілізованого стандарту з VCAM-1 людини, 200 нг/мл після відновлення

1 – флакон **Контролю, високого рівня**, ліофілізованого

1 – флакон **Контролю низького рівня**, ліофілізованого

1 – флакон (5 мл) **20x Концентрат буферу для аналізу** (PBS з 1% Tween 20 та 10% БСА)

1 – баночка (50мл) **20x концентрату Промивного буферу** (PBS з 1% Tween 20)

1 – флакон (15 мл) **Розчину субстрату** (тетраметилбензидину)

1 - флакон (15мл) **Стоп розчину** (1M фосфорної кислоти)

2 - **клейкі плівки**

#### 5. ІНСТРУКЦІЯ ЩОДО ЗБЕРІГАННЯ – ІФА НАБОРУ

Зберігати реагенти набору при температурі від 2°C до 8°C, за винятком контролів. Ліофілізовані контролі зберігати при температурі -20°C. Одразу після використання реагенти, які залишилися слід повернути в холодне приміщення (2°C-8°C), контролі, відповідно - до -20°C. Термін придатності набору та реагентів вказаний на етикетках.

Термін придатності компонентів набору можна гарантувати лише за умови правильного зберігання компонентів, і якщо у разі багаторазового використання одного компоненту, цей реагент не забрудниться при першій обробці.

#### 6. ЗАБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

Супернатант культуральних клітин, сироватка, плазма (ЕДТА, цитратна, гепаринова) та навколоплідних вод були аналізовані за допомогою цього аналізу. Інші біологічні зразки можуть бути придатні для використання в аналізі.

Видалить із сироватки або плазми згустки або клітини якомога скоріше після згортання та відокремлення.

Зразки, що мають видимий осад, слід очистити перед використанням в аналізі. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпемічні зразки.

Зразки слід аликвотувати та зберігати замороженими при температурі -20°C, щоб уникнути втрати біоактивного VCAM-1 людини. Якщо зразки повинні бути запущені протягом 24 годин, то їх слід зберігати при температурі 2°C- 8°C (щодо стабільності зразків дивитися пункт 13.5).

Уникати повторних циклів розмороження/замороження. До початку аналізу, заморожені зразки слід повільно довести до кімнатної температури та обережно перемішати.

#### 7. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- градуйовані піпетки з об'ємом 5 мл та 10 мл
- регульовані одноканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками з об'ємом від 5 мкл до 1000 мкл
- регульовані багатоканальні мікропіпетки з одноразовими наконечниками, об'ємом від 50 мкл до 300 мкл
- контейнер для багатоканальних піпеток
- стакани, колби, циліндри, необхідні для приготування реагентів
- пристрій для подавання промивного розчину (багатоканальний пляшка для води або автоматична система промивання)
- мікролунковий зчитувач для стрипів зі здатністю зчитування при 450 нм (620 нм як необов'язкова референсна довжина хвилі)
- дистильована або деіонізована вода
- статистичний калькулятор з програмою для виконання регресійного аналізу

#### 8. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ

- Усі хімічні речовини слід вважати потенційно небезпечними. Тому, рекомендуємо, щоб цей продукт обробляли лише особи, які пройшли навчання з лабораторних методик, і використовувати його відповідно до принципів належної лабораторної практики. Носіть відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід бути обережним, щоб уникнути попадання на шкіру чи в очі. У разі попадання на шкіру чи в очі, негайно промийте водою. Для отримання конкретних порад див. паспорт з безпеки хімічних речовин або заходи безпеки.
- Реагенти призначені тільки для дослідження і не повинні використовуватися для діагностичних або терапевтичних процедур.

- Не змішуйте реагенти та не замінійте іншими з різних лотів або інших джерел.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, який вказано на етикетці.
- Під час зберігання або інкубації не піддавати реагенти сильному впливу сонячного світла.
- Не піпетуйте ротом.
- Не можна їсти, або курити в місцях обробки зразків або реагентів набору.
- Уникайте попадання реагентів або зразків на шкіру або слизові оболонки.
- Під час обробки реагентів або зразків, слід одягати резинові або одноразові латексні рукавички.
- Уникати контакту розчину субстрату з окисниками або металами.
- Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
- Для того, щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть зробити тест недійсним, використовуйте одноразові наконечники для піпеток та /або піпетки.
- Використовуйте чисті спеціальні лотки для внесення реагентів кон'югату та субстрату.
- Вплив кислоти інактивує кон'югат.
- Для підготовки реагентів слід використовувати дистильовану або деіонізовану воду.
- Перед використанням розчин субстрату повинен бути кімнатної температури.
- Дезактивувати та утилізувати зразки та всі потенційно забруднені матеріали, оскільки вони можуть містити збудники інфекції. Кращим способом дезактивації є автоклавування протягом 1 години при 121,5 °С.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти та нейтралізовані відходи, можна змішувати з гіпохлоритом натрію в таких обсягах, що кінцева суміш містить 1,0% гіпохлориту натрію. Залишіть на 30 хвилин для ефективної дезактивації. Рідкі відходи, що містять кислоту, потрібно нейтралізувати перед додаванням гіпохлориту натрію.

## 9. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Концентрати буферу слід привести до кімнатної температури та розвести перед початком процедури аналізу. Якщо у **Концентраті (20x) промивного буферу** утворилися кристали, то його потрібно нагріти до повного розчинення цих кристалів.

### 9.1 Промивний буфер (1x)

Вилийте весь вміст (50 мл) Концентрату промивного буферу (20x) у чистий 1000 мл градуйований циліндр. Довести до кінцевого об'єму 1000 мл із дистильованою або деіонізованою водою. Обережно перемішайте, щоб не утворилася піна.

Перенесіть у чисту пляшку для миття і зберігайте при температурі від 2 °С до 25 °С. Зверніть увагу, що промивний буфер (1x) стабільний протягом 30 днів.

Промивний буфер (1x), також можна приготувати за потребою відповідно до наступної таблиці:

Кількість стрипів	Концентрат промивного буферу (20x) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

### 9.2 Буфер для аналізу (1x)

Налити увесь вміст (5 мл) Буферного концентрату для аналізу (20x) у чистий 100мл градуйований циліндр. Доведіть до кінцевого об'єму 100 мл дистильованою водою. Обережно перемішайте, щоб не утворилась піна. Зберігати при температурі 2°С - 8°С. Пам'ятайте, що буфер для аналізу (1x) стабільний протягом 30 днів.

Буфер для аналізу (1x), також можна приготувати за потребою відповідно до наступної таблиці:

Кількість стрипів	Буферний концентрат для аналізу (20x) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2,5	47,5
1 - 12	5,0	95,0

### 9.3 Кон'югатна суміш

**Зверніть увагу, що Кон'югатну суміш потрібно використовувати протягом 30 хвилин після розведення.**

Кон'югатну суміш (біотин-кон'югат, змішану зі стрептавідином-HRP) необхідно розвести 1:100 за допомогою буфера для аналізу (1x) безпосередньо перед використанням у чистій пластиковій пробірці.

Кон'югатну суміш можна приготувати при необхідності відповідно до наступної таблиці:

Кількість стрипів	Кон'югатна суміш (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97

## 9.4 Стандарт VCAM-1 людини

Відновіть **Стандарт VCAM-1 людини**, додавши дистильовану воду.

Об'єм відновлення вказаний на етикетці флакону зі стандартом. Покрутіть або обережно перемішайте для повного та однорідного розчинення. (концентрація відновленого стандарту = 200 нг/мл).

Для відновлення, залишіть стандарт на 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед проведенням розведень.

Якщо після використання стандарт залишився, то його не можна зберігати, а потрібно утилізувати.

**Розведення стандарту** можна робити безпосередньо на мікротитровому планшеті (див. 10 d.) або у пробірках (див. 9.4.1).

### 9.4.1 Зовнішнє розведення стандарту

Позначте 6 пробірок, по одній для кожного стандарту: S1, S2, S3, S4, S5, S6. Потім підготуйте серійні розведення 1:2 для стандартної кривої наступним чином:

Піпетуйте 225 мкл Буфер для аналізу (1x) у кожну пробірку.

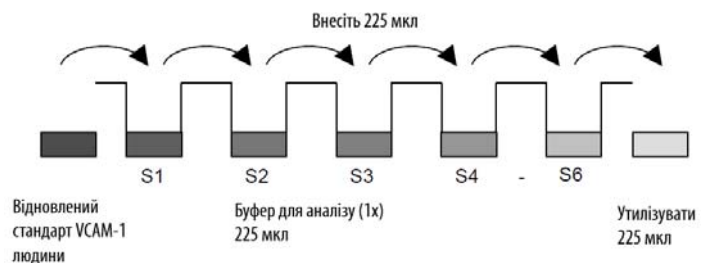
Піпетувати 225 мкл відновленого стандарту (концентрація стандарту = 200 нг/мл) у першу пробірку з міткою S1 та перемішайте (концентрація стандарту 1 = 100 нг/мл).

Піпетувати 225 мкл цього розведення у другу пробірку з міткою S2, та ретельно перемішайте перед наступною передачею.

Повторіть серійні розведення ще 4 рази, створивши точки стандартної кривої (див. Малюнок 1).

Буфер для аналізу (1x) служить як бланк.

Малюнок 1



## 9.5 Контролі

Відновити, додаючи 150 мкл дистильованої води до ліофілізованого **контролю** (10 - 30 хвилин). Покрутити або обережно перемішати, щоб забезпечити повну і однорідну солюбілізацію. Далі обробляйте контролі, як і зразки в аналізі.

Для діапазону контролю зверніться до сертифіката аналізу або етикетки на флаконі.

Зберігати відновлені контролі в аліквоті при температурі -20 °С. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.

## 10. ПРОТОКОЛ ТЕСТУ

1. Перед початком тестової процедури попередньо розведіть свої зразки. Розведіть зразки сироватки та плазми 1:50 за допомогою буферу для аналізу (1x) за наступною схемою: 10 мкл зразка + 490 мкл буферу для аналізу (1x).

2. Визначте кількість мікролункових смужок необхідних для тестування потрібної кількості зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для запуску бланків та стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк та додатковий контрольний зразок повинен бути проаналізований у двох примірниках. Зніміть зайві мікролункові смужки із тримача і зберігайте у пакеті з фольги разом з осушувачем при температурі 2 °С - 8 °С та герметично закритим.

3. Двічі промийте мікролункові смужки приблизно 400 мкл **Буферу для промивання** на лунку з ретельним аспіруванням вмісту мікролунки між миттям. Залишіть Буфер для промивання в лунках приблизно на **10 - 15 секунд** перед аспіруванням. Слідкуйте за тим, щоб не подрпати поверхню мікролунки.

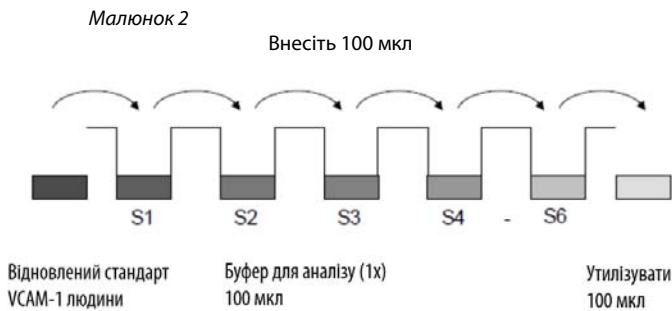
Після останнього етапу промивання, очистіть лунки та поставте мікролункові смужки на абсорбуючий паперовий рушник, щоб видалити зайвий буфер для промивання. Використовуйте мікролункові смужки відразу після миття. Альтернативно, мікролункові смужки можна розмістити догори дном на мокрому абсорбуючому папері не довше, ніж 15 хвилин. **Не допускайте висихання лунок.**

4. **Розведення стандарту на мікролунковому планшеті** (альтернативно, розведення стандарту можна підготувати і у пробірках - див. 9.4.1):

Додайте 100 мкл Буферу для аналізу (1x) у двох примірниках до усіх **лунок із стандартом**. Піпетуйте 100 мкл приготовленого **стандарту** (дивитися Приготування стандарту 9.4, концентрація = 200.0 нг/мл) у

двох примірників у лунку A1 та A2 (див. Таблиця 1). Перемішайте вміст лунок A1 та A2, повторюючи аспірування та видалення (концентрація стандарту 1, S1 = 100.0 нг/мл), та переносячи 100 мкл до лунок B1 та B2, відповідно (див. Малюнок 2). Подбайте про те, щоб не подряпати поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 4 рази, створюючи два ряди стандартних розведень VCAM-1 людини від 100.0 до 3.1 нг / мл.

Утилізуйте 100 мкл вмісту з останніх використаних мікролунок (F1, F2).



У випадку **зовнішніх стандартних розведень** (див. 9.4.1), піпетуйте 100 мкл цих стандартних розведень (S1 – S6) у стандартні лунки відповідно до Таблиці 1.

Таблиця 1: У таблиці показаний приклад розташування бланків, стандартів та зразків у мікролункових смужках:

	1	2	3	4
<b>A</b>	Стандарт 1 (100.0 нг/мл)	Стандарт 1 (100.0 нг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
<b>B</b>	Стандарт 2 (50.0 нг/мл)	Стандарт 2 (50.0 нг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
<b>C</b>	Стандарт 3 (25.0 нг/мл)	Стандарт 3 (25.0 нг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
<b>D</b>	Стандарт 4 (12.5 нг/мл)	Стандарт 4 (12.5 нг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
<b>E</b>	Стандарт 5 (6.3 нг/мл)	Стандарт 5 (6.3 нг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
<b>F</b>	Стандарт 6 (3.1 нг/мл)	Стандарт 6 (3.1 нг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
<b>G</b>	Бланк	Бланк	Зразок 7	Зразок 7
<b>H</b>	Контроль	Контроль	Зразок 8	Зразок 8

- Додайте 100 мкл Буферу для аналізу (1x) у двох примірниках до **лунок з бланком**.
- Додайте 100 мкл кожного **попередньо розведеного зразка** у двох примірниках до лунок зі зразком.
- Підготуйте Кон'югатну суміш (див. Підготовка реагентів кон'югатна суміш 9.3)
- Додайте 50 мкл розведеної (1:100) **кон'югатної суміші** до усіх лунок, включаючи лунки із бланком.
- Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18°C - 25°C) протягом 2 годин, якщо є можливість на шейкері мікропланшетів, встановленому на 400 об/хв.
- Зніміть клейку плівку та очистіть лунки. промийте мікролункові стрічки 3 рази відповідно до пункту с. тестового протоколу. негайно перейдіть до наступного етапу.
- Піпетуйте 100 мкл **Розчину субстрату ТМБ** до усіх лунок.
- Інкубуйте мікролункові смужки при кімнатній температурі (18°C до 25°C) протягом приблизно 10 хвилин. Не піддавати впливу сильного світла.

**Потрібно контролювати розвиток кольору на планшеті та припинити реакцію субстрату (див. Наступний пункт цього протоколу), перш ніж позитивні лунки не будуть належним чином записуватись. Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольорів слід проводити індивідуально для кожного аналізу.**

Рекомендується додавати стоп-розчин, коли найвищий стандарт отримав темно-синій колір. Альтернативно, розвиток кольорів може контролювати зчитувач ELISA при 620 нм. Реакцію субстрату слід припинити, як тільки Стандарт 1 досягнув ОЩ 0.9 – 0.95.

- Зупиніть ферментну реакцію, швидко піпетуючи по 100 мкл **Стоп-розчину** в кожен лунку. Важливо, щоб Стоп-розчин розповсюджувався швидко та рівномірно по мікролунках, щоб повністю інактивувати фермент. Результати слід зчитати одразу після додавання Стоп-розчину або протягом однієї години, якщо мікролункові смужки зберігаються при температурі 2 ° C - 8 ° C у темному місці.
- Зчитати абсорбцію кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як основну довжину хвилі (додатково 620 нм як референсна довжина хвилі; допустимо від 610 нм до 650 нм відповідно). Бланкувати зчитувач планшетів згідно інструкцій виробника, використовуючи бланк-лунки. Визначте абсорбцію як зразків, так і стандартів.

**Примітка: У разі інкубації без струшування отримані значення ОЩ можуть бути нижчими, ніж зазначено нижче. Тим не менш, результати все ще дійсні.**

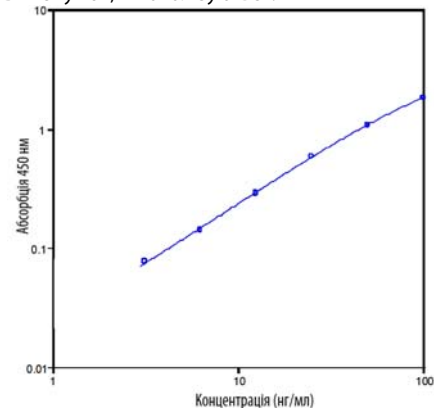
## 11. ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- Обчисліть середні значення абсорбції для кожного набору дублікатів стандартів та зразків. Дублікати повинні бути в межах 20 відсотків від середнього значення.
- Створіть стандартну криву, відзначаючи середні значення абсорбції для кожної концентрації стандарту на осі ординат проти концентрації VCAM-1 людини на осі абсцис. Проведіть криву через ці точки (рекомендовано, 5-параметрову криву).
- Щоб визначити концентрацію циркулюючого VCAM-1 людини для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення абсорбції на ординаті та продовжіть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину протягніть вертикальну лінію до абсциси та зчитайте відповідну концентрацію VCAM-1 людини.
- Якщо дотримуватися інструкцій цього протоколу, зразки сироватки і плазми розбавляють 1:50 (10 мкл зразка + буфера для аналізу(1x) 490 мкл), і концентрацію, зчитана зі стандартної кривої, потрібно помножити на коефіцієнт розведення (x 50).**
- Обчислення зразків з концентрацією, що перевищує стандарт 1, може призвести до неправильних, низьких рівнів людського VCAM-1. Такі зразки потребують подальшої попереднього зовнішнього розведення відповідно до очікуваних значень VCAM-1 людини з буфером для аналізу (1x), щоб точно визначити фактичний рівень VCAM-1 людини.**
- Рекомендовано, щоб кожна станція досліджень встановлювала контрольний зразок відомої концентрації VCAM-1 людини, і запускала цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані результати знаходяться поза очікуваним діапазоном контролю, вони можуть бути недійсними.
- На малюнку зображена репрезентативна стандартна крива. Цю криву не можна використовувати для отримання результатів тестувань. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи мікролункових смужок, які аналізуються.

Малюнок 3:

Репрезентативна стандартна крива для ІФА sVCAM-1 людини. VCAM-1 людини був розведений у послідовно у двох етапах у буфері для аналізу (1x).

Не використовуйте цю стандартну криву, щоб отримати результати тесту. Стандартну криву слід запускати для кожної групи мікролункових смужок, які аналізуються.



Таблиця 2: Типові дані за допомогою ELISA VCAM-1 людини

Вимірювальна довжина хвилі: 450 нм, референсна довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	Концентрація VCAM-1 людини (нг/мл)	ОЩ при 450 нм	Середня ОЩ при 450 нм	КВ (%)
1	100.0	1.808 1.837	1.823	0.8
2	50.0	1.080 1.058	1.069	1.0
3	25.0	0.582 0.583	0.583	0.1
4	12.5	0.284 0.288	0.286	0.7
5	6.3	0.144 0.141	0.142	1.1
6	3.1	0.077 0.078	0.078	0.6
Бланк	0	0.032 0.028	0.030	6.7

Значення ОЩ стандартної кривої можуть змінюватись залежно від умов проведення аналізу (наприклад, оператор, метод піпетування, метод промивання або вплив температури). Крім того, термін придатності набору може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Виміряні значення залишаються дійсними.

## 12 ОБМЕЖЕННЯ

- Оскільки, точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, для кожного прогону необхідно встановити стандартну криву.
- Бактеріальне або грибокве забруднення скринінгових зразків, або реагентів, або перехресне забруднення між реагентами може спричинити помилкові результати.
- Одноразові наконечники на піпетки, колби або скляний посуд є кращими, скляний посуд для багаторазового використання необхідно вимити та ретельно промити від усіх детергентів перед використанням.
- Неправильне або недостатнє миття на будь-якому етапі процедури можуть призвести або до помилково позитивних або до помилково негативних результатів. Перед внесенням свіжого миючого розчину повністю випорожніть лунки, заповніть буфером для промивання, як зазначено для кожного циклу промивання, і не допускайте, щоб лунки були непокритими або сухими протягом тривалого періоду.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість пацієнтів із антитілами (НАМА) людського проти мишачого IgG. НАМА може порушувати аналізи з використанням мишачих моноклональних антитіл, що призводить до помилково позитивних та помилково негативних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можна проаналізувати в таких аналізах, коли до зразка додати мишачі імуноглобуліни (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла, що мають невідповідну специфічність).

## 13 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 13.1 Чутливість

Межа виявлення людського VCAM-1, визначена як концентрація аналіту, що призводить до абсорбції значно вищої, ніж середовище для розведення (середнє плюс 2 стандартні відхилення), становить 0.6 нг/мл (середнє значення 6 незалежних аналізів).

### 13.2 Відтворюваність

#### 13.2.1 В аналізі

Відтворюваність в аналізі була оцінена у 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків сироватки, що містять різні концентрації VCAM-1 людини. Запускали 2 стандартні криві для кожного планшету. Нижченаведені дані, показують середню концентрацію VCAM-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка (див. Таблицю 3). Загальний коефіцієнт варіації становить 3.1%.

Таблиця 3

Середня концентрація VCAM-1 людини та коефіцієнт варіації для кожного зразка

Зразок	Експеримент	Середня концентрація VCAM-1 людини (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1	1550.5	1.9
	2	1429.1	1.7
	3	1397.5	0.3
2	1	689.2	1.4
	2	698.3	2.6
	3	660.6	3.0
3	1	781.8	3.2
	2	808.7	1.5
	3	732.5	1.3
4	1	543.2	6.1
	2	575.5	2.4
	3	500.3	2.7
5	1	395.4	3.4
	2	461.1	7.4
	3	430.4	8.3
6	1	435.3	1.4
	2	458.4	3.3
	3	431.5	2.5
7	1	384.7	6.0
	2	412.1	2.0
	3	368.1	0.6
8	1	460.0	3.2
	2	498.6	2.8
	3	458.8	4.5

### 13.2.2 Між аналізами

Відтворюваність між аналізами в одній лабораторії оцінювали у 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повторами 8 зразків, що містять різні концентрації VCAM-1 людини. 2 стандартні криві запускали для кожного планшету. Дані, наведені нижче, показують середню концентрацію VCAM-1 у людини та коефіцієнт варіації, обчислений на 18 визначеннях кожного зразка (див. Таблицю 4). Обчислений загальний коефіцієнт варіації між тестами становив 5.2%.

Таблиця 4

Середня концентрація VCAM-1 людини та коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середня концентрація VCAM-1 людини (нг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
1	1459.0	5.5
2	682.7	2.9
3	774.3	5.0
4	539.7	7.0
5	428.9	7.7
6	441.7	3.3
7	388.3	5.7
8	472.5	4.8

### 13.3 Введення добавки

Введену добавку оцінювали шляхом додавання 7 рівнів VCAM-1 людини в об'єднані зразки нормальної сироватки. Добавки були визначені у 3 незалежних експериментах з 6 повторами для кожної.

Кількість ендogenous VCAM-1 людини у концентрованій сироватці віднімали від значень з добавкою.

Відновлення становило від 85% до 104% із загальним середнім відновленням 89%.

### 13.4 Паралелізм розведення

4 зразки сироватки з різними рівнями VCAM-1 людини аналізували при серійних двократних розведеннях з 4 повторами для кожного. Відновлення становило від 87% до 120% із загальним відновленням 100% (див. Таблицю 5).

Таблиця 5

Зразок	Розведення	Очікувана концентрація VCAM-1 людини (нг/мл)	Спостережувана концентрація VCAM-1 людини (нг/мл)	Відновлена концентрація VCAM-1 людини (%)
1	1:50	--	1409.3	--
	1:100	704.6	639.5	91
	1:200	352.3	306.0	87
	1:400	176.2	166.2	94
2	1:50	--	639.1	--
	1:100	319.5	308.3	97
	1:200	159.8	174.2	109
	1:400	79.9	86.9	109
3	1:50	--	795.3	--
	1:100	397.7	368.2	93
	1:200	198.8	189.5	95
	1:400	99.4	94.5	95
4	1:50	--	508.8	--
	1:100	254.4	244.8	96
	1:200	127.2	152.7	120
	1:400	63.6	70.1	110

### 13.5 Стабільність зразка

#### 13.5.1 Стабільність під час розмороження/замороження

Аліквоти зразків сироватки (з добавками чи без добавок) зберігали при температурі -20°C та розморожували 5 разів і визначили рівні VCAM-1 людини. Не спостерігалось значної втрати імунореактивності VCAM-1 людини, визначеної шляхом заморожування та розморожування.

#### 13.5.2 Стабільність зберігання

Аліквоти зразків сироватки (з добавками чи без добавок) зберігали при температурі -20 °C, 2 °C - 8 °C, кімнатній температурі (КТ) та при 37 °C, а рівень VCAM-1 людини визначали через 24 години. Не було виявлено значних втрат імунореактивності VCAM-1 людини, визначених під час зберігання при температурі -20 °C, 2 °C - 8 °C та КТ.

Значну втрату імунореактивності (20%) VCAM-1 людини було визначено під час зберігання при температурі 37°C після 24 год.

### 13.6 Порівняння сироватки та плазми

Збір сироватки, а також ЕДТА, цитрат- та гепаринову плазму одночасно зробили від двох осіб та тестували на людський VCAM-1. Концентрації

суттєво не відрізнялися, і тому всі ці препарати крові придатні для використання в аналізі.

Тим не менш, дуже рекомендується забезпечити рівномірність препаратів крові.

### 13.7 Специфічність

Аналіз виявляє як природний, так і рекомбінантний людський VCAM-1. Втручання циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом додавання цих білків у фізіологічно відповідних концентраціях до позитивної сироватки VCAM-1 людини. Не виявлено перехресної реактивності, особливо з іншими членами гена імуноглобуліну надсімейства.

### 13.8 Очікувані значення

Панелі з 40 сироватками крові, а також EDTA, цитрат- та гепарин- зразками плазми від випадково відібраних здорових донорів (чоловіків та жінок) тестували на людський VCAM-1.

Виміряні рівні можуть змінюватися залежно від використовуваного методу збору зразків.

Для визначених рівнів VCAM-1 людини див. Таблицю 6.

Таблиця 6

Матриця зразків	Кількість оцінюваних зразків	Діапазон (нг/мл)	Середнє (нг/мл)	Стандартне відхилення (нг/мл)
Сироватка	40	400.6 – 1340.8	772.4	207.2
Плазма (EDTA)	40	297.1 – 1563.3	704.7	304.1
Плазма(цитрат)	40	131.3 – 1222.7	763.5	224.4
Плазма (гепарин)	40	343.9 – 1254.2	670.2	235.5

## 14 КОРОТКИЙ ОПИС ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТУ

### 14.1 Промивний буфер (1x)

Додайте **Концентрат буферу для промивання** 20x (5 мл) до 950 мл дистильованої води.

Кількість смужок	Концентрат буферу для промивання (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

### 14.2 Буфер для аналізу (1x)

Додайте **Концентрат буферу для аналізу** 20 x (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

Кількість смужок	Концентрат буферу для аналізу (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

### 14.3 Суміш кон'югату

Зробіть розведення **Суміші кон'югату** (біотин-кон'югат змішаний з Стрептавідином –HRP) у буфері для аналізу (1x) перед використанням:

Кількість смужок	Суміш кон'югату (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

### 14.4 Стандарт VCAM-1 людини

Відновіть ліофілізований **стандарт VCAM-1 людини** дистильованою водою. (Об'єм відновлення вказаний на етикетці флакону зі стандартом.

### 14.5 Контролі

Додайте 150 мкл дистильованої води до ліофілізованих **контролів**.

## 15 РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛУ ТЕСТУ

- Зробіть попереднє розведення зразків з Буфером для аналізу (1x) 1:50.
- Визначіть необхідну кількість мікролункових стрипів.
- Двічі промийте мікролункові стрипи з Буфером для промивання.
- Розведення стандарту на мікролунковому планшеті:  
Додайте 100 мкл буферу для аналізу, у двох примірниках, до усіх лунок зі стандартом.  
Піпетуйте 100 мкл приготовленого стандарту у перші лунки та створіть стандартні розведення, переносячи 100 мкл з лунки до лунки.  
Утилізуйте 100 мкл з останніх лунок.  
Альтернативно зовнішнє стандартне розведення в пробірках (див. 9.4.1):  
Піпетуйте 100 мкл цих стандартних розведень у мікролункові смужки.
- Додайте 100 мкл Буферу для аналізу (1x), у двох примірниках, до бланк-лунок.

- Додайте 100 мкл попередньо розведених зразків, у двох примірниках, у лунки для зразків.
- Підготуйте Суміш кон'югату.
- Додайте 50 мкл суміші кон'югату до усіх лунок.
- Накрийте мікролункові стрипи та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18°C- 25°C).
- Очистіть та промийте мікролункові стрипи 3 рази з Буфером для промивання.
- Додайте 100 мкл Розчину субстрату ТМБ до усіх лунок.
- Інкубуйте мікролункові стрипи приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (18°C - 25°C).
- Додайте 100 мкл Стоп розчину до усіх лунок.
- Очистіть мікролунковий зчитувач та виміряти інтенсивність кольору при 450 нм.

### Примітка:

**Якщо дотримуватися інструкцій цього протоколу, зразки слід розбавити 1:50 (10 мкл зразки + 490 мкл буфера для аналізу (1x)) і концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на коефіцієнт розведення (x 50).**

## ВИКОРИСТАНІ СИМВОЛИ

Символ	Означення
	Знак європейської відповідності
	Прочитайте інструкцію щодо використання*
	Пристрій для діагностики <i>in vitro</i>
	Номер в каталозі *
	Номер лоту*
	Достатньо для <n> тестів*
	Обмеження температури*
	Використати до *
	Виробник*
	Увага*
RUO	Тільки для дослідження
Distributed by	Розповсюджується
Content	Вміст
Volume/No.	Об'єм/ №





#### **ВИРОБНИК**

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drq-diagnostics.de](http://www.drq-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### **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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

