

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
КОНЦЕНТРАЦІЇ MMP-3

3168, Aeskulisa MMP-3

Кат. № : **3168**

Методика від **01-07-2014**

Кількість : **96**

Версія **001**

Виробник : **AESKU. Diagnostics,**
(Німеччина)



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

1 Призначення

AESKULISA MMP-3 являє собою твердофазний імуноферментний аналіз з використанням двох різних моноклональних анти-людських-MMP-3 антитіл для кількісного визначення концентрації MMP-3 в сироватці крові людини.

Аналіз є інструментом в діагностиці ревматоїдного артриту.

2 Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Зразки сироватки, розбавлені **1:10**, інкубуються в лунках, які покриті моноклональними антитілами проти людського MMP-3. Під час цього процесу MMP-3, присутні в сироватці, зв'язуються з антитілом на планшеті; незв'язана фракція вимивається промиванням в наступному кроці. Потім додаються моноклональні анти-людські MMP-3 антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (кон'югат). Під час інкубації відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло в мікропланшетах. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Зв'язаний MMP-3 виявляється за допомогою ферментативної кольорової реакції (синій) субстрату, яка зупиняється за допомогою розведеної кислоти (різка зміна кольору на жовтий). Інтенсивність прояву кольору хромогену залежить від кількості кон'югату, пов'язаного з антитілом-MMP-3-комплексу і, отже, прямо пропорційна концентрації в сироватці MMP-3.

3 Комплект поставки

МАЮТЬ БУТИ ВІДНОВЛЕНІ				
Компонент	Кількість	Колір ковпачка	Колір розчину	Опис/вміст
Буфер для зразків (5x)	1 x 20 мл	Білий	Жовтий	5 x концентрований Тріс, NaCl, BSA, азид натрію < 0.1% (консервант)
Промивний буфер (50x)	1 x 20 мл	Білий	Зелений	50 x концентрований Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію < 0.1% (консервант)
ГОТОВІ ДО ВИКОРИСТАННЯ				
Компонент	Кількість	Колір ковпачка	Колір розчину	Опис/вміст
Негативний Контроль	1 x 1.5 мл	Зелений	Безколірний	Очищений MMP-3 людини, BSA, азид натрію < 0.1% (консервант)
Позитивний Контроль	1 x 1.5 мл	Червоний	Жовтий	Очищений MMP-3 людини, BSA, азид натрію < 0.1% (консервант)
Калібратори	6 x 1.5 мл	Білий	Жовтий*	Концентрація калібраторів: 0, 5, 20, 50, 100, 200 нг/мл. Очищений MMP-3 людини, BSA, азид натрію < 0.1% (консервант)
Кон'югат	1 x 15 мл	Синій	Синій	Анти-людський MMP-3, кон'югований з пероксидазою хрому, BSA
Субстрат ТМБ	1 x 15 мл	Чорний	Безколірний	Стабілізований ТМВ/H ₂ O ₂
Стоп Розчин	1 x 15 мл	Білий	Безколірний	1 М соляної кислоти
Мікропланшет	12 x 8-лункових	--	--	смужки, які відокремлюються

смужок	Покриття див. пункт 1
* Колір збільшується з концентрацією	
НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ	
Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Складний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір. Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-е вид).	

4 Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і Мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 1 місяця при температурі 2-8 °C/35-46 °F, як мінімум. Реагенти і Мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.

5 Безпека використання

5.1 Небезпека для здоров'я

Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтеся наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN₃) як консервант. NaN₃ може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN₃ може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте під час роботи з набором. Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

Комплект містить матеріал тваринного походження, як зазначено в таблиці змісту, поводитись відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

У разі, якщо інформація про продукт, в тому числі маркування, є спотвореною або неправильною, будь ласка, зверніться до виробника чи постачальника тест-набору.

Не змішуйте і не замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-26 °C/68-78.8 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при температурі не вище 26 °C/78.8 °F для автоматизованих систем.

Ніколи не надавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки проведеного тесту, але має бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень. Діагноз повинен бути перевірений з використанням різних методів діагностики.

6 Відбір зразків, використання та зберігання

Використовуйте переважно зібрані нещодавно зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог. Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватка з частинками повинна бути очищена центрифугуванням з низькою швидкістю (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки.

Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати на протязі перших 8 годин, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до 48 годин або замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7 Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед початком роботи

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для зразків 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Щоб уникнути помилок ми пропонуємо позначити ковпачки різних калібраторів.

Розведення Зразків пацієнтів:

Розвести зразки сироватки **1:10** буфером для зразка (1x)

Наприклад, 450 мкл буфера для зразків + 50 мкл сироватки.

Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок, наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для аналізу. Видалити зайві лунки з рамки, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, щільно закритими (2-8 °C/35-46 °F).

7.2 Схема Піпетування



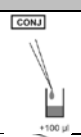

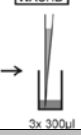



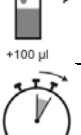
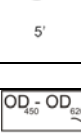
Ми пропонуємо піпетувати калібратори, контролі і зразки таким чином:

	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	...	
H	Cal D	NC	...	

Cal A: калібратор A	Cal D: калібратор D	PC: позитивний контроль (NC: негативний контроль)	P1: пацієнт 1
Cal B: калібратор B	Cal E: калібратор E		P2: пацієнт 2
Cal C: калібратор C	Cal F: калібратор F		P3: пацієнт 3

7.3 Проведення тестування

Крок	Опис
1.	Переконайтеся, що підготовка відповідно до пункту 7.1 вище була проведена перед піпетуванням.
2.	Використовуйте наступні кроки для отримання необхідних кількісних/якісних результатів:
КОНТРОЛІ І ЗРАЗКИ	
3.	Внести в зазначені лунки, як описано в розділі 7.2 вище, 100 мкл: <ul style="list-style-type: none"> Калібраторів (CAL.A до CAL.F) Негативного контролю (NC) і Позитивного контролю (PC), і Розведеної сироватки пацієнта (P1, P2 ...)

4.	 Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F.
5.	 Промити 3 рази з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
КОН'ЮГАТ	
6.	 Внести 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
7.	 Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F.
8.	 Промити 3 рази з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
СУБСТРАТ	
9.	 Внести 100 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку.
10.	 Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F, захищений від інтенсивного світла.
СТОП РОЗЧИН	
11.	 Внести 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, що і при піпетуванні субстрату.
12.	 Витримати 5 хвилин мінімум.
13.	Ретельно струшувати пластину протягом 5 сек.
14.	 Виміряти оптичну щільність при 450 нм (рекомендується 450/620 нм) протягом 30 хвилин.

8 Кількісна Інтерпретація

Для **кількісної інтерпретації** побудувати стандартну криву, відклавши оптичну щільність (OD) кожного калібратора (вісь Y) по відношенню до відповідних значень концентрації в нг/мл (вісь X). Для досягнення найкращих результатів ми рекомендуємо використання log/lin координат та 4-Параметрове налаштування. З OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в нг/мл.

AESKULISA MMP-3	Нормальний діапазон	Сумнівний діапазон	Позитивні результати
Жінки	0-20 нг/мл	20-30 нг/мл	> 30 нг/мл
Чоловіки	0-40 нг/мл	40-50 нг/мл	> 50 нг/мл

Приклад стандартної кривої

Не використовувати для інтерпретації результатів пацієнтів!

Калібратори MMP-3	OD 450/620 нм	CV % (Варіація)
0 нг/мл	0.033	2.2
5 нг/мл	0.105	4.0

20 нг/мл	0.336	1.7
50 нг/мл	0.727	1.2
100 нг/мл	1.328	1.6
200 нг/мл	2.228	3.7

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат (нг/мл)
P 01	0.264/0.258	0.261	17.2
P 02	1.323/1.326	1.325	97.5

Зразки вище значення найвищого діапазону калібровача слід представляти у вигляді > Max. Вони повинні бути розведені в міру необхідності і знову аналізовані. Зразки нижче значень діапазону калібровача повинні бути представлені у вигляді < Min.

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контролі і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

У випадку, коли значення контролів не відповідають критеріям, тест є недійсним і повинен бути повторений.

Наступні технічні дані повинні бути перевірені: термін придатності (приготовлених) реагентів, умови зберігання, піпетки, прилади, фотометр, умови інкубації і методи промивки.

Якщо протестовані зразки показують значення, які відхиляються від встановлених, або критерії перевірки не виконуються без вагомих причин, будь ласка, зверніться до виробника чи постачальника тест-набору.

9 Технічні дані

Матеріал зразка: сироватка
 Об'єм зразка: 10 мкл зразка, розведеного 1:10 в 1х буфері для зразків
 Загальний час інкубації: 90 хвилин при 20-26 °C/68-78.8 °F
 Діапазон калібрування: 0-200 нг/мл
 Аналітична чутливість: 5 нг/мл
 Зберігання: при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони
 Кількість визначень: 96 тестів

10 Робочі характеристики

10.1 Аналітична Чутливість

80 тестів з буфером для зразків з AESKULISA® MMP-3 дало Межу Бланка 4 нг/мл і тестування 8 сироваток з низькою концентрацією MMP-3 у 8 аналізах дало межу виявлення 5 нг/мл.

10.2 Специфічність

Мікропланшет, покритий мишачими моноклональними анти- людськими MMP-3 антитілами. Перехресної реактивності з іншими антигенами не виявлено.

10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (нг/мл)	Очікувана концентрація (нг/мл)	Відновлення (%)
1	1/10	178.4	178.4	100.0
	1/20	86.1	89.2	96.5
	1/40	45.0	43.0	104.6
	1/80	23.2	22.5	103.0
2	1/10	88.8	88.8	100.0
	1/20	44.1	44.4	99.4
	1/40	22.8	22.1	103.1
	1/80	11.3	11.4	99.5

10.4 Точність

Для контролю точності аналізу, п'ять сироваток в різних ділянках стандартної кривої були використані для визначення варіабельності (між і

в середині аналізу та від партії до партії), в якому відтворюваність була досліджена в 5 аналізах, по 8 повторень. Відтворюваність від партії до партії була досліджена, в результаті чого п'ять сироваток були досліджені з 3 різних партій в 8 повтореннях.

Intraassay		
Sample no.	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	12.6	4.9
2	30.5	3.6
3	59.3	3.2
4	101.0	3.6
5	195.1	3.4

Interassay		
Sample no.	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	12.6	7.6
2	30.5	4.5
3	59.3	4.5
4	101.0	4.8
5	195.1	4.6

10.5 Калібрування

За відсутності міжнародного стандарту, AESKULISA MMP-3 відкалібрований проти певних кількостей очищеного рекомбінантного людського MMP-3 (з використанням SEC-MALS встановленої чистоти: > 99%). Результати надані в нг/мл.

10.6 Відновлення

Відновлення було визначено додаванням визначених кількостей рекомбінантного людського MMP-3 до різних людських сироваток:

Зразки сироватки	% відновлення	Коефіцієнт R ²
1	101.4	0.9934
2	91.8	0.9938
3	88.5	0.9923

10.7 Клінічна оцінка

MMP-3 у здорових людей

Для визначення нормального діапазону значень MMP-3 156 зразків сироватки здорових донорів крові (46 жінок і 110 чоловіків) були проаналізовані.

AESKULISA MMP-3	Number	Min (ng/ml)	Max (ng/ml)	Med (ng/ml)	95 percentile
Healthy men	110	8.9	56.6	25.3	41.9
Healthy women	46	5.1	32.5	14.2	29.7

Нормальні діапазони визначаються з встановлених значень наступним чином:

AESKULISA MMP-3	Normal range	Borderline	Positive results
Women	0 - 20 ng/ml	20-30 ng/ml	> 30 ng/ml
Men	0 - 40 ng/ml	40-50 ng/ml	> 50 ng/ml

MMP-3 в різних аутоімунних захворюваннях в порівнянні з ревматоїдним артритом і у здорових людей

У загальній кількості 627 зразків сироватки (дивись таблицю) були проаналізовані на концентрацію MMP-3. Результати наведені в таблиці:

Disease	Number	Min (ng/ml)	Max (ng/ml)	Med (ng/ml)	Pos	Neg
Spondylarthritis	80	0.0	287.4	14.3	29 (36.3%)	51 (63.8%)
Coeliac disease	15	5.9	22.8	12.6	1 (6.7%)	14 (93.3%)
Coeliac disease + DH	32	8.5	142.4	28.3	19 (59.4%)	13 (40.6%)
SLE	24	14.5	200.8	46.2	22 (91.7%)	2 (8.3%)
Vasculitis	117	5.2	283.5	47.9	97 (82.9%)	20 (17.1%)
Healthy	156	8.9	56.6	22.0	3 (1.9%)	153 (98.1%)
Rheumatoid arthritis	203	0.7	280.2	33.2	139 (68.5%)	64 (31.5%)

SLE = системний червоний вовчак, DH = герпетичний дерматит

Як описано в літературі, підвищені концентрації MMP-3 знаходяться при різних запальних захворюваннях. MMP-3, отже, не підходить для діагностики ревматоїдного артриту. MMP-3 є маркером активності ревматоїдного артриту. Концентрації MMP-3 у пацієнтів з РА корелюються з індивідуальною активністю захворювання.

Пояснення символів, що використовуються на маркуванні:

	Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i>
	Каталоговий номер
	Код партії
	СЕ маркування
	Національний знак відповідності
	96 тестів
	Ознайомлення з інструкціями для застосування
	Використати до

	Температурні обмеження (2-8 °C)
	Виробник
	Калібратор Cut-off
	Позитивний контроль
	Негативний контроль
	Калібратор
	Відновлювач
	Кон'югат
	Мікропланшет
	Планшет
	Промивний буфер
	Субстрат
	Стоп розчин
	Буфер для зразків



AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co.KG
 Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Germany
 Phone: +49-6734-9622-0
 FAX: +49-6734-9622-2222
 WWW.AESKU.COM



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

