

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФОЛАТУ ТА ВІТАМІНУ B12

## 7825-300, Folate/Vitamin B12 Anemia Panel VAST Test System

Каталог. №: 7825-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind (США)

Методика від 16-07-2019

Версія 3



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

### 1.0 ВСТУП

**Призначення:** Кількісне визначення концентрації Вітаміну B12 та Фолату в сироватці і плазмі людини за допомогою ІФА, Колориметричний.

### 2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Фолат відіграє важливу роль у розвитку мозку і тому життєво важливий під час росту. Найбільш поширеними дефектами, що виникають унаслідок дефіциту фолатів, є дефекти нервової трубки. З тим, що фолат займає важливе місце у синтезі нуклеїнових кислот, було визнано, що додавання фолатів корисно під час вагітності та інших випадків швидкого росту тканин. Фолат також відіграє вирішальну роль у підтримці належного балансу гомоцистеїну, що є фактором, який сприяє виникненню оклюзійних судинних захворювань та інсульту. Особи зі схильністю до хвороб серця та деяких форм раку можуть також використовувати добавки.<sup>1,2,3</sup>

Основними джерелами фолієвої кислоти є зелені листові овочі, бобові, боби та збагачені крупи. Продукти, збагачені фолієвою кислотою, фактично збагачені фолієвою кислотою через більшу біодоступність для всмоктування організмом. В обігу фолат присутній у кількох різних формах, деякі з яких стабільніші за інших. Фолієва кислота та N-methyltetrahydrofolate є двома загальнопринятими формами, остання є більш стійкою і виявляється у більш високих концентраціях у сироватці. Через стабільність молекули methyltetrahydrofolate дуже часто застосовується як форма, на яку орієнтуються під час аналізів.<sup>3,4</sup>

Фолатні зв'язуючі білки відповідають за метаболізм фолатів. У кровообігу існують два типи: один тип приймає участь у зв'язуванні з поверхнею клітин, а інша розчинна форма існує в кровообігу. Ці білки, що зв'язують фолат, також мають здатність зв'язувати декілька різних похідних фолату, включаючи фолієву кислоту та N-methyltetrahydrofolate. Взаємодія фолієвої кислоти з білками, що зв'язують фолат, є сильнішою, ніж methyltetrahydrofolate. Поточні аналізи на ринку вимагають етапу екстракції для вивільнення похідних фолату з білка, зв'язуючого фолат.<sup>4,5</sup>

Вітамін B12 - це один з дев'яти водорозчинних вітамінів, важливих для функціонування здорового організму. Найважливіші ролі вітаміну B12 в організмі людини - це формування еритроцитів та утворення мієлінової оболонки навколо нервів. Оскільки ефекти спостерігаються в системах організму з великим діапазоном функцій, симптоми дефіциту вітаміну B12 іноді можуть бути дуже неоднозначними. Дефіцит також може тривати від місяців до років, щоб проявитися, залежно від причини та ступеню тяжкості.<sup>6,7,8</sup>

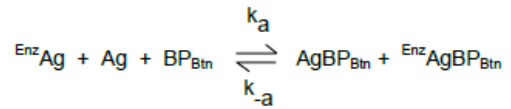
Дві з найпоширеніших причин дефіциту вітаміну B12 - дієта та вік. Оскільки основним джерелом вітаміну B12 є тварини, вегани, які не ефективно доповнюють свою дієту, піддаються ризику. Люди похилого віку також піддаються підвищеному ризику через їх дієту, а також менш ефективне функціонування їх травної системи.<sup>6,8,9</sup>

Два дуже корисних тести для розмежування дефіциту вітаміну B12 та дефіциту фолієвої кислоти: метилмалоніл СоА (ММА) та гомоцистеїн (hcy). Обидва дефіцити представлені подібними симптомами; однак, хоча обидва з них показують підвищений рівень гомоцистеїну, лише дефіцит вітаміну B12 викликає збільшення метилмалонілу СоА. Вважається, що підвищення рівня метилмалонілу СоА та гомоцистеїну є основною причиною будь-яких симптомів, що супроводжують дефіцит вітаміну B12. Високий рівень цих двох аналітів у крові породжує підвищений окислювальний стрес клітин, що викликає підвищений апоптоз. У свою чергу, судинне захворювання призводить до атеросклерозу, ішемічної хвороби серця та/або нейродегенерації (наприклад, хвороби Паркінсона).<sup>6, 10, 11</sup>

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Фолат - Аналіз конкурентного зв'язування білків (ТИП 8):

Необхідні реагенти для конкурентного зв'язування включають білок специфічного зв'язування, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген. При змішуванні кон'югату фермент-антиген, біотинильованого зв'язуючого білка і сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція конкуренції між нативним антигеном і кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість сайтів зв'язування. Взаємодія описується наступним рівнянням:



$\text{BP}_{\text{BtN}}$  = Біотинильований зв'язуючий білок (постійна величина)

$\text{Ag}$  = Нативний антиген (змінна величина)

$\text{EnzAg}$  = Кон'югат фермент-антиген (постійна величина)

$\text{BP}_{\text{BtN}}$  = Комплекс антиген-зв'язуючий білок

$\text{EnzAgBP}_{\text{BtN}}$  = Комплекс фермент-антиген-зв'язуючий білок

$k_a$  = Постійна швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Постійна швидкості дисоціації

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

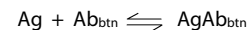
Відбувається одночасна взаємодія між біотином, прикріпленим до зв'язуючого білка, та стрептавідином, іммобілізованим на поверхні мікролунок. Це впливає на поділ пов'язаної фракції ферменту зв'язуючого білка після декантатії або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{BtN}} + \text{EnzAgBP}_{\text{BtN}} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \Rightarrow$  іммобілізований комплекс  
 $\text{Streptavidin}_{\text{CW}}$  = Стрептавідин, іммобілізований на поверхні лунок  
Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею

Активність ферменту в фракції зв'язування білка обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи декілька різних референтних сироваток з відомою концентрацією антигену, будується крива, з якої концентрація антигенів у невідомих зразках може бути встановлена.

#### Вітамін B12 - Конкурентний імуноаналіз з затримкою (ТИП 9):

Реагенти, що вимагаються для твердофазного імуноферментного аналізу, включають антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. При змішуванні біотинильованих антитіл з антигеном, що містить сироватку, відбувається реакція між антигеном і антитілом. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:

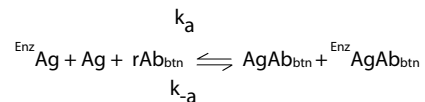


$\text{Ab}_{\text{BtN}}$  = біотинильовані антитіла

$\text{Ag}$  = антиген (змінна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{BtN}}$  = комплекс антиген-антитіло

Після короткої інкубації додається ферментний кон'югат (це відкладене на пізніше додавання дозволяє підвищити чутливість для зразків з низькою концентрацією). Після додавання ферментного кон'югату відбувається конкуренція між ферментним аналогом і антигеном в зразку за обмежену кількість зв'язуючих сайтів (не використаних в першій інкубації).



$\text{EnzAg}$  = кон'югат фермент-антиген (постійна величина)

$\text{EnzAgAb}_{\text{BtN}}$  = комплекс кон'югат - антитіло

$r\text{Ab}_{\text{BtN}}$  = біотинильоване антитіло, яке не прореагувало під час першої інкубації

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

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

Відбувається реакція між біотином, пов'язаним з антитілами, і Стрептавідином, іммобілізованим в лунках мікропланшетів. Це дозволяє відокремити фракцію, пов'язану з антитілами, при декантуванні або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{BtN}} + \text{EnzAgAb}_{\text{BtN}} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \Rightarrow$  іммобілізований комплекс

$\text{Streptavidin}_{\text{CW}}$  = стрептавідин, іммобілізований в лунках

Імобілізований комплекс = «сендвіч» комплекс, пов'язаний з твердою фазою (поверхнею лунок)

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 поставляються, для 96 лунок:

**A. Комбіновані Калібратори Фолат/Вітамін В12 – 1 мл/флакон**

6 флаконів референтної сироватки з концентраціями, зазначеними нижче. Містить консерванти.

Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні еталонних препаратів, зазначених в таблиці.

Аналіт	Фолат (нг/мл)	Вітамін В12 (пг/мл)
A	0.0	0
B	1.0	125
C	2.5	250
D	5.0	500
E	10.0	1000
F	25.0	2500

**B. Ферментний реагент Фолату – 7.0 мл/флакон**

Один (1) флакон, що містить кон'югат Фолат (аналог)- пероксидаза хрому (HRP) в білковій стабілізуючій матриці з барвником. Зберігати при температурі 2-8 °С.

**C. Біотиновий реагент Фолату – 7.0 мл/флакон**

Один (1) флакон, що містить кон'югат біотинильований очищений фолат-зв'язуючий білок в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

**D. Ферментний реагент Вітаміну В12 – 7.0 мл/флакон**

Один флакон, що містить Вітамін В12 (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині. Зберігати при 2-8 °С.

**E. Біотинильований Вітамін В12 - 7.0 мл/флакон**

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до Вітаміну В-12, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °С.

**F. Концентрат буфера для промивок – 20.0 мл/флакон**

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С до 60 днів.

**G. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок**

Один 96-луноквий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

**H. Реагент субстрату - 12 мл/флакон**

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

**I. Стоп-розчин – 8.0 мл/флакон**

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при 2-8 °С.

**J. Вивільнюючий агент – 14.0 мл/флакон**

Один флакон, що містить сильну основу (гідроксид натрію) і ціанід калію. Зберігати при 2-8 °С.

**K. Стабілізуючий агент - 0.7 мл/флакон**

Один флакон, що містить розчин ТСЕР. Зберігати при 2-8 °С.

**L. Нейтралізуючий буфер – 7.0 мл/флакон**

Один флакон, що містить буфер з барвником, що знижує рН екстракції зразка. Зберігати при 2-8 °С.

**M. Інструкція до набору.**

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

**Зауваження 2:** Уникайте тривалого впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів позначені на етикетці.

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

#### 4.1 Необхідні, але не надані з набором матеріали

1. Мікродозатори на 50 і 100 мкл з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери змінного обсягу (200-1000 мкл) для кон'югату
4. Скляні тестові пробірки для калібраторів, контролів і зразків
5. Мікропланшетний вошер або бутель, що стискається
6. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм
7. Фільтрувальний папір для висушування лунок
8. Пластикова плівка або кришка для інкубації мікропланшетів
9. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивок
10. Таймер

#### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro**

**Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах**

потенційно небезпечний матеріал. 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 проходити відповідно до місцевих регулятивних і нормативних вимог.

#### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать сироватка крові, плазма за типом. Дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для точного порівняння, щоб встановити нормальні значення, зразок сироватки повинен бути отриманий натщесерце вранці. Кров слід збирати в пробірці з червоним верхом Redtop (з або без добавок гелю) або для плазми використовувати вакуумні трубки, що містять гепарин. Дайте крові згорнутися для зразків сироватки. Центрифугувати зразки, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити вибірку голодування.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, то вони можуть зберігатися при температурі -20 °С протягом до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування і відтавання. При аналізі в дублікатах необхідно 100 мкл зразка для кожного маркера анемії.

#### 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 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

**1. Буфер для промивок**

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

**2. ЕКСТРАКЦІЙНИЙ АГЕНТ**

Додати аликвоту стабілізуючого агента для того, щоб підготувати 1/40 (стабілізуючий агент/вивільнюючий агент) розведеного розчину. Наприклад, щоб підготувати 4 мл (4000 мкл), додати 0,100 мл (100 мкл) стабілізуючого агента до 3.9 мл (3900 мкл) вивільнюючого агента.

**3. ЕКСТРАКЦІЯ ЗРАЗКА (Див. примітку 3)**

Підготувати достатню кількість пробірок для підготовки всіх зразків пацієнтів, контролів і калібраторів. Розлити 0.10 мл (100 мкл) всіх зразків в окремі пробірки. Піпетувати 0.050 мл (50 мкл) підготовленого екстракційного агента в кожен пробірку, струшуючи (див. примітку 3) після кожного додавання. Дозволити реакції протікати протягом 15 хвилин. Наприкінці 15 хвилин додати 0.050 мл (50 мкл) нейтралізуючого буфера, перемішати (див. примітку 3).

**Для Фолату:** Після додавання нейтралізуючого буфера і перемішування, завершити реакцію, і зачекати додатково 5 хвилин перед внесенням в лунки. Час очікування не потрібен для вітаміну В12.

**Примітка 1:** Не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбав блакитне забарвлення.

**Примітка 2:** Не використовувати забруднені реагенти і реактиви з видимим ростом бактерій.

**Примітка 3:** Рекомендується використання мультисенсорного (3) вортекса.

**Примітка 4:** Надзвичайно важливим є точне дозування правильного об'єму з використанням каліброваної піпетки і внесення близько до нижньої частини скляних пробірок під кутом, торкаючись стінки пробірки.

**Примітка 5:** Зразки з високою концентрацією білка слід розбавити 1:1 фізіологічним розчином перед виконанням екстракції.

**Примітка 6:** Див. [www.monobind.com/education-center](http://www.monobind.com/education-center) щодо покровоного керівництва по екстракції зразка для Вітаміну B12 (&фолієвої кислоти).

## 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\*\***

### Для фолієвої кислоти:

- Підготуйте всі зразки відповідно до процедури "Екстракція зразка" в розділі "8.0 Підготовка реагентів"; важливо почекати 5 хвилин, перш ніж продовжити, щоб дозволити реакції нейтралізації йти до завершення (див. вище).
- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 50 мкл відповідних екстрагованих калібратора Фолату, контролю або зразка у відповідні лунки.
- Додати 0.050 мл (50 мкл) ферментного реагенту Фолату в усі лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Додайте по 0.050 мл (50 мкл) Біотинового реагенту Вітаміну Фолату в кожну лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Накрийте мікропланшет і інкубуйте 45 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл 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 гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть розчин і повторіть 2 додаткових рази.
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку. 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 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл 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 кожної лунки на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референтній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Примітка 1:** Розвести зразки з концентраціями вище 25 нг/мл 1:5 з Калібратором Фолату '0' нг/мл і повторити аналіз.

**Примітка 2:** Дуже важливо вносити всі реагенти в центр лунки. Завжди додавайте реагенти в тому ж порядку, щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.

### Для Вітаміну B12:

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 50 мкл відповідних екстрагованих калібратора Вітаміну B12, контролю або зразка у відповідні лунки.
- Додати 0.050 мл (50 мкл) Біотинового Реагенту Вітаміну B12 в усі лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Накрийте та інкубуйте 45 хвилин при кімнатній температурі.
- Додайте по 0.050 мл (50 мкл) ферментного реагенту Вітаміну B12 в кожну лунку. Додавати точно зверху на внесені в лунки реагенти.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.

- Накрийте мікропланшет і інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл 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 гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть розчин і повторіть 2 додаткових рази.
- Додайте по 100 мкл 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 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл 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 (вимірювання проводити при референтній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Примітка 3:** Розвести зразки з концентраціями вище 2000 пг/мл 1:5 або 1:10 '0' Калібратором і знову проаналізувати.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації відповідного маркера в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1 та прикладі 2.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації відповідного маркера в зазначених одиницях (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Для визначення концентрації відповідного маркера 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).

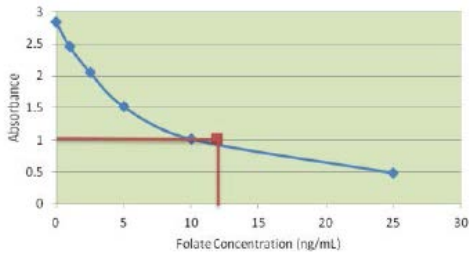
**Примітка:** Якщо програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути встановлена.

\*Дані, малюнки і таблиці нижче призначені тільки для прикладу. Не використовуйте їх для розрахунку результатів.

Приклад 1 – Фолат

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (пг/мл)
Калібратор А	A1	2.812	2.839	0
	B1	2.865		
Калібратор В	C1	2.437	2.455	2.5
	D1	2.473		
Калібратор С	E1	2.058	2.055	5
	F1	2.051		
Калібратор D	G1	1.542	1.518	5
	H1	1.494		
Калібратор E	A2	1.003	1.015	10
	B2	1.027		
Калібратор F	C2	0.453	0.485	25
	D2	0.516		
Зразок	E2	1.004	1.021	11.9
	F2	1.038		

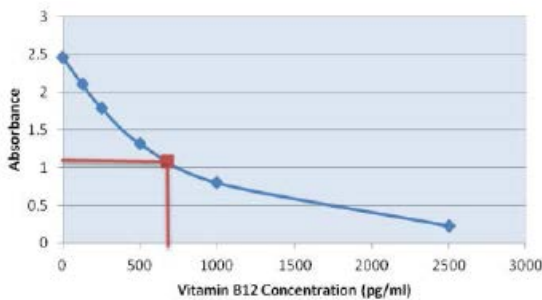
Малюнок 1 - Фолат



Приклад 2 – Вітамін B12

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.475	2.457	0
	B1	2.438		
Калібратор В	C1	2.153	2.106	125
	D1	2.059		
Калібратор С	E1	1.819	1.792	250
	F1	1.764		
Калібратор D	G1	1.351	1.316	500
	H1	1.28		
Калібратор E	A2	0.828	0.803	1000
	B2	0.778		
Калібратор F	C2	0.236	0.231	2500
	D2	0.225		
Зразок	E2	1.052	1.087	680.5
	F2	1.122		

Малюнок 2 – Вітамін B12



### 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора 0 пг/мл  $\geq$  1.8.
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 не відтворюваних 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. Дотримуватись 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 випробувань системи були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенційні взаємодії між деякими зразками сироватки і реагентами можуть привести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, можуть стати проблемою для всіх видів імуноаналізу. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта і всіма іншими клінічними даними.
4. Для отримання дійсних результатів адекватної контролю та інші параметри повинні знаходитись 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 відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

### 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референтних інтервалів для "нормальної" популяції очікувані діапазони для даної тестової системи детально викладені в таблицях 1 і 2.

Таблиця 2  
Очікувані значення для Фолату

Нормальне доросле населення > 3.0 нг/мл

Таблиця 1  
Очікувані значення для Вітаміну B-12

Населення	пг/мл	пмоль/л
Новонароджені	160 - 1300	118 - 959
Дорослі	200 - 835	148 - 616
Дорослі > 60 років	110 - 800	81 - 590

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 тестової системи для визначення Фолату визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення ( $\delta$ ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 3 і 4.

ТАБЛИЦЯ 3  
Точність в аналізі (нг/мл)

Зразок	N	x	$\delta$	C.V., %
Рівень 1	24	3.72	0.31	8.3
Рівень 2	24	9.26	0.53	5.7
Рівень 3	24	13.71	0.83	6.1

ТАБЛИЦЯ 4  
Точність між аналізами (нг/мл)

Зразок	N	x	$\delta$	C.V., %
Рівень 1	12	3.32	0.32	9.6
Рівень 2	12	8.85	0.68	7.7
Рівень 3	12	12.85	1.15	8.9

\*вимірювання проводились в 10 постановках в дублях на протязі 10 днів.

Точність набору всередині серії і між серіями тестової системи для визначення Вітаміну B12 визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення ( $\delta$ ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 5 і 6.

**ТАБЛИЦЯ 5**  
Точність в аналізі (пг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	334.8	24.3	7.3 %
Нормальний	20	484.9	17.6	3.6 %
Високий	20	925.3	28.3	3.1 %

**ТАБЛИЦЯ 6**  
Точність між аналізами (пг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	18	314.9	49.4	15.7%
Нормальний	18	441.3	46.7	10.6%
Високий	18	913.1	39.4	4.8%

\*вимірювання проводились в 10 постановках в дублях на протязі 10 днів.

#### 14.2 Чутливість

Тестова Система має чутливість для різних аналітів, які перераховані в наступній таблиці 7. Чутливість (межа визначення) визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту 0 пг/мл плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

**ТАБЛИЦЯ 7**

Analyte	Sensitivity
Folate	0.52 ng/ml
Vitamin B12	70.13 pg/ml

#### 14.3 Достовірність

Тест-систему ІФА Фолат AccuBind® порівнювали з еталонним методом. Біологічні зразки були використані зі значеннями, які варіювалися від 3.2 нг/мл до 13.7 нг/мл. Загальна кількість таких зразків становить 30. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для ІФА для визначення фолієвої кислоти в порівнянні з референтним методом. Отримані дані представлені в таблиці 8.

**ТАБЛИЦЯ 8 - Фолат**

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод (Y)	7.76	$y=0.162+1.07x$	0.984
Метод порівняння (X)	8.46		

Тестова система для визначення Вітаміну В12 порівнювалась з затвердженим референтним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом вітаміну В-12 (діапазон значень 156 - 1830 пг/мл). Загальна кількість зразків була 56. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референтним методом. Отримані дані наведені в таблиці 9.

**ТАБЛИЦЯ 9- Вітамін В12**

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод (Y)	654.3	$y=1.0186x - 48.82$	0.951
Метод порівняння (X)	690.2		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референт-методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

#### 14.4 Специфічність

Специфічність зв'язуючого білка фолієвої кислоти, використовуваної для обраних речовин, оцінювалась шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях.

**ТАБЛИЦЯ 10- Фолат**

Substance	Interference
Bilirubin	ND*
Biotin	ND*
Lipemia	ND*

\*ND = Не виявляється

Перехресні реакції антитіл до Вітаміну В-12 з різними речовинами оцінювались додаванням речовин, що впливають, в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою впливаючої речовини і дозою вітаміну В-12, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

**ТАБЛИЦЯ 11- Вітамін В12**

Речовина	Перехресна реактивність
Білірубін	0.0003
Ревматоїдний фактор	0.0008
Кобінамід	< 0.0001
Ліпемія	< 0.0001
Гемоглобін	< 0.0001



Monobind, Inc.  
100 North Pointe Drive  
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 [www.monobind.com](http://www.monobind.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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

