

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РОЗЧИННОГО ТРАНСФЕРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА МЕТОДОМ ІФА

Transferrin Soluble Receptor (sTfR) Test System

Кат. №: 8625-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 2



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 sTfR у сироватці або плазмі людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

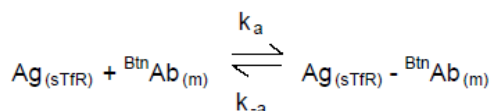
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (ТИП 4)

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані) з різним і чітким розпізнаванням епітопів у надлишку та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні мікропланшета через взаємодію стрептавідину, нанесеного в лункою, та екзогенно доданого біотинильованого моноклонального антитіла до sTfR.

Після змішування моноклонального біотинильованого антитіла та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція між нативним антигеном та антитілом, утворюючи комплекс антитіло-антиген. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надмірна кількість);

$\text{Ag}_{(\text{sTfR})}$ = Нативний антиген (змінна кількість);

$\text{Ag}_{(\text{sTfR})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Комплекс антиген-антитіло;

k_a = Константа швидкості асоціації

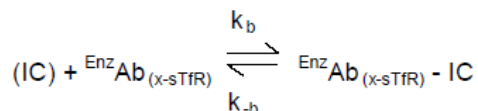
k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

$\text{Ag}_{(\text{sTfR})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})} + \text{стрептавідин}_{\text{с.в.}} \Rightarrow \text{іммобілізований комплекс (IC)}$

Стрептавідин_{св} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

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

Після відповідного періоду інкубації фракція, пов'язана з антитілом та антигеном, відокремл (м)юється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Додається ще одне антитіло (спрямоване на інший епітоп), мічене ферментом. Інша взаємодія відбувається для утворення на поверхні лунок ферменту, міченого комплексом антитіло-антиген-біотинильоване антитіло. Надлишок ферменту змивається за допомогою етапу промивання. Додають відповідний субстрат для отримання кольору, що вимірюється за допомогою мікропланшетного спектрофотометра. Активність ферментів у лунці прямо пропорційна концентрації природного вільного антигену. За допомогою декількох різних еталонів сироватки з відомою концентрацією антигену може бути сформована крива реакції на дозу, за якою можна встановити концентрацію невідомого антигену.



$\text{EnzAb}_{(\text{x-sTfR})}$ = Фермент-мічені антитіла (надмірна кількість);

$\text{EnzAb}_{(\text{x-sTfR})} - \text{IC}$ = Комплекс антиген-антитіло

k_b = Константа швидкості асоціації

k_{-b} = Константа швидкості дисоціації

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори sTfR - 0.5 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсної сироватки для sTfR з концентраціями 0 (A), 3.0 (B), 10 (C), 20 (D), 40 (E) і 80 (F) нмоль/л (nmol/l). Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

B. Ферментний реагент sTfR - 12.0 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон кон'югату sTfR (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в стабілізуючій білковій матриці з червоним барвником. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Біотиновий Реагент sTfR - 12.0 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон реагенту містить кон'югат анти-sTfR біотинильованих очищених IgG кролика в буфері, з червоним барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий 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 - 20.0 мл (мл)/флакон

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

F. Субстратний розчин - 14.0 мл (мл)/флакон

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

G. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5M (M) H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів ідентифікована на етикетці.

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

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.010 мл (мл) (10 мкл (µl)) та 0.050 мл (мл) (50 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, що перевищує 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, 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 проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка або гепаринізована плазма за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірку для венепункції з червоною кришкою з добавками чи без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або вакуумну пробірку, що містить EDTA або гепарин (для плазми). Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (мг)/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 0.020 мл (мл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролі 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 умові експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

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

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, калібратори і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

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

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, калібраторів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте піпеткою по 10 мкл (μl) калібраторів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) Біотинового Реагенту sTfR в усі лунки.
4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
5. Накрийте і інкубуйте протягом 45 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
7. Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще 2 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.
8. Додайте по 100 мкл (μl) Ферментного реагенту анти-sTfR у кожну лунку.
9. Накрийте і інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
10. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
11. Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його.
12. 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.

13. 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

14. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
15. 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.
16. 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 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Розведіть зразки, концентрація яких, можливо, вище 80 нмоль/л (nmol/l) з '0' нмоль/л (nmol/l) калібратором і помножьте результат на коефіцієнт розведення.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації sTfR в невідомих зразках використовується калібрвальна крива.

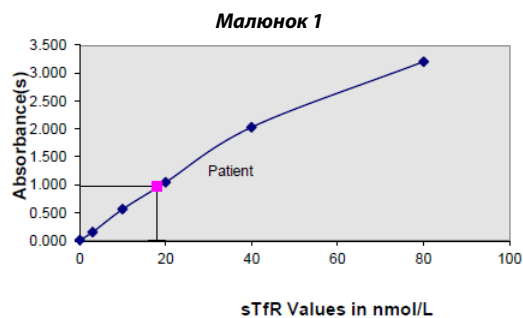
1. Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
2. Для побудови калібрвальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації sTfR в нмоль/л (nmol/l) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрвальну криву.
4. Визначте концентрації sTfR в контролях і зразках, використовуючи калібрвальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.978 перетинає стандартну криву при 18.0 нмоль/л (nmol/l) (див. мал.1)

Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нмоль/л (nmol/l))
Калібратор А	A1	0.012	0.013	0.0
	B1	0.013		
Калібратор В	C1	0.156	0.156	3.0
	D1	0.157		
Калібратор С	E1	0.579	0.567	10.0
	F1	0.555		
Калібратор D	G1	1.075	1.048	20.0
	H1	1.021		
Калібратор E	A2	2.069	2.032	40.0
	B2	1.995		
Калібратор F	C2	3.240	3.204	80.0
	D2	3.168		
Пацієнт 1	E3	0.958	0.978	18.0
	F3	0.998		

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



Absorbance(s) - Абсорбція(ї)
 sTfR Values in nmol/L - Значення Розчинного Трансферинного Рецептора в нмоль/л
 Patient - Пацієнт

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібратора «0» нмоль/л (nmol/L) повинна бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS і форма аналізу ризику для цього продукту доступні за запитом від компанії Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. 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 - відповідно до вимог Директиви 98/79/EC IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою за Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або 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 процедур з 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 і, 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.

4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі 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 розраховувані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених довідкових інтервалів для «нормального» дорослого населення, очікувані діапазони для Тест-системи sTfR AccuBind® ІФА докладно описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для Тест-системи sTfR

СЕРЕДНЄ	ДІАПАЗОН
18.4 нмоль/л (nmol/L)	8.7 - 28.1 нмоль/л (nmol/L)

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 перевірок 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. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

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

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нмоль/л (nmol/L))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	10.67	0.62	5.8
Нормальний	20	21.25	0.93	4.4
Високий	20	34.54	1.40	4.1

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (нмоль/л (nmol/L))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	5	11.19	0.85	7.6
Нормальний	5	22.07	2.25	10.2
Високий	5	32.47	2.03	6.3

14.2 Чутливість

Тест-система sTfR AccuBind® ІФА має чутливість 0.055 нмоль/л (nmol/L). Чутливість була встановлена шляхом визначення мінімальності калібратора сироватки 0 нмоль/л (nmol/L) та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Специфічність

% перекресної реактивності антитіл sTfR на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перекресна реактивність була обчислена шляхом виведення відношення між дозою додаткової речовини і дозою sTfR, необхідної для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

ТАБЛИЦЯ 4

Субстанція	Перекресна реактивність
Диферичний трансферин людини	H/B
Апотрансферин людини	H/B
Феритин людського серця	H/B
Феритин печінки людини	H/B
Феритин селезінки людини	H/B
Тріолеїн	H/B
Альбумін сироватки людини	H/B
Білірубін	H/B
Гемоглобін	H/B



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 Поінт 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

