

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІОГЛОБІНУ МЕТОДОМ ІФА

Myoglobin Test System

Кат. №: 3225-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 5



Основою 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 концентрацій Циркулюючого Міоглобіну в сироватці крові людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

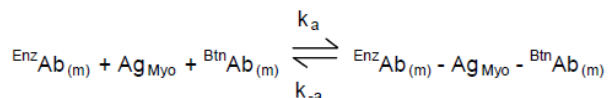
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до міоглобіну.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

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

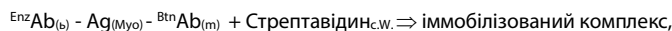
$\text{Enz Ab}_{(m)}$ = ферментно-мічене моноклональне антитіло (надлишкова кількість)

$\text{Enz Ab}_{(b)} - \text{Ag}_{(\text{Myo})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{c.w.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Імобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Міоглобіну - 2.0 мл (мл)/флакон (сухі)

6 флаконів референсного матеріалу для антигена Міоглобіну з концентраціями 0 (A), 10 (B), 25 (C), 50 (D), 150 (E) і 400 (F) нг/мл (ng/ml).

Розвести кожен флакон з 2.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні протягом 30 днів

при температурі 2-8 °C (°C). Для того, щоб зберігати протягом більш тривалого періоду часу аліквотувати відновлені калібратори в криопробірках і зберігати при температурі -10 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУВАТИ/РОЗМОРОЖУВАТИ БІЛЬШ НІЖ ОДИН РАЗ.** Консервант було додано.

Примітка: Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні гравіметричної ваги білка з > 99% очищеного препарату, як видно з PAGE.

B. Ферментний реагент Міоглобіну - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить фермент-мічене очищене антитіло і біотинильоване моноклональне IgG миші в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

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

E. Субстрат А - 7.0 мл (мл)/флакон

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

F. Субстрат В - 7.0 мл (мл)/флакон

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

G. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-30 °C (°C).

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

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

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) та 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторної подачі об'ємів 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю до 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контейнер для зберігання промивного буфера.
10. Дистильована або деіонізована вода.
11. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, NHS.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка за типом, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок

або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (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/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) 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 умовах 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 (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C (°C).

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

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

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) калібраторів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Ферментного реагенту Міоглобіну. Дуже важливо вносити всі реагенти близько до дна лунки. Примітка: Використовуйте багатоканальну піпетку, щоб швидко вносити ферментний реагент, щоб уникнути дрейфу, якщо дозування займає більше, ніж кілька хвилин.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.
- Інкубувати протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Виміряйте

величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

ПРИМІТКА: Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Міоглобіну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Міоглобіну в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Міоглобіну в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.532 перетинає стандартну криву при 43 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

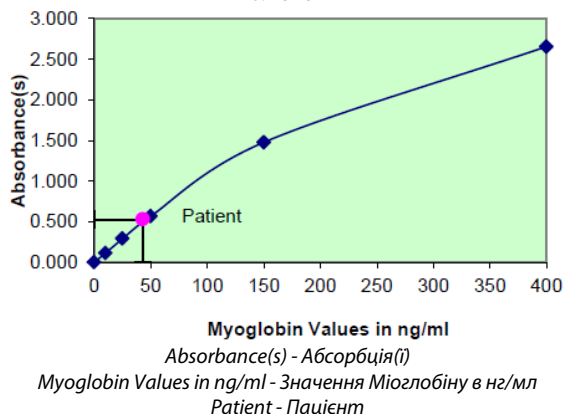
Примітка: Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для аналізу ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація нг/мл (ng/ml)
Калібратор А	A1	0.003	0.004	0
	B1	0.004		
Калібратор В	C1	0.115	0.118	10
	D1	0.121		
Калібратор С	E1	0.287	0.293	25
	F1	0.299		
Калібратор D	G1	0.555	0.571	50
	H1	0.586		
Калібратор E	A2	1.487	1.479	150
	B2	1.470		
Калібратор F	C2	2.750	2.656	400
	D2	2.563		
Контроль 1	E2	0.601	0.594	52.0
	F2	0.586		
Контроль 2	G2	1.330	1.334	133
	H2	1.338		
Пацієнт	A3	0.549	0.532	43.0
	B3	0.515		

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

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібратора «А» повинна бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна 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 невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентраціями Міоглобіну вище 400 нг/мл (ng/ml) можуть бути розведені з нульовим калібратором, вільною від Міоглобіну об'єднаної сироватки крові людини або сечі і повторно аналізовані. Помножте отримане значення на коефіцієнт розбавлення, щоб отримати коректне значення.
10. 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.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/EC IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з 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. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
4. 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.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Реагенти для процедур з використанням AccuBind® IFA були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тестовими реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто спричиняють ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. (Boscato LM Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin. Chem 1988:3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу слід використовувати у поєднанні з клінічним обстеженням, історією хворого та усіма іншими клінічними даними.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення Міоглобіну систематично такі ж самі в плазмі та сироватці крові. Тим не менш, кращим зразком сироватки є зразок, який був швидко відділений від еритроцитів. Рівні міоглобіну вище в підготовлених спортсменів або людей, які звикли до щоденних фізичних навантажень. На підставі клінічних даних, зібраних Monobind відповідно до опублікованої літератури наступні діапазони були призначені. **Ці діапазони повинні використовуватися тільки як рекомендації:**

Дорослі (нормальні значення) ≤ 96 нг/мл (ng/ml)

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірена 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 розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

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

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	σ	C.V., %
Пул 1	20	7.71	0.82	10.6
Пул 2	20	31.3	1.67	5.3
Пул 3	20	118	3.43	2.9

ТАБЛИЦЯ 3

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

Зразок	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	8.15	0.79	9.7
Рівень 2	10	36.7	1.45	3.9
Рівень 3	10	124	5.54	4.5

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

14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється при визначенні варіабельності 0 нг/мл (ng/ml) калібратора сироватки і з використанням 2σ (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Чутливість аналізу становить 0.178 нг/мл (ng/ml).

14.3 Точність

Тест-систему Міоглобін AccuBind® IFA порівнювали з радіоімунним аналізом. Біологічні зразки населення були використані (симптоматичного і безсимптомного). (Значення варіювалися від N/D до 118 нг/мл (ng/ml)). Загальна кількість таких зразків була 202. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	24.37	$Y = -1.97 + 1.12(X)$	0.989
Метод порівняння	25.34		

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

14.4 Специфічність

Перехресна реактивність методу Міоглобін IFA на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання інтерферуючих речовин в матрицю сироватки в наступних концентраціях. Система антитіл, яка використовується, не виявила гемоглобін, Креатинкіназу-MB, cTnI або FABP при випробуванні при дуже високих концентраціях. Наявність ліпемії (25 мг/мл (mg/ml)), гемоглобіну (4.0 мг/мл (mg/ml)) і білірубину (2.5 мг/мл (mg/ml)) не впливають на точність аналізу.

14.5 Хук-Ефект

Тест не буде залежати від концентрації міоглобіну до 10000 нг/мл (ng/ml) в сироватці, плазмі або сечі. Однак зразки, які, як очікується, будуть більші ніж 400 нг/мл (ng/ml), повинні бути розведені 1:10 і 1:100 в нормальній об'єднаній людській сироватці і нормальний пул повинен бути проаналізований разом, щоб отримати базове значення. Базове значення і коефіцієнт розбавлення слід брати до уваги, щоб отримати відкореговану концентрацію міоглобіну в зразку.



ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поїнт Драйв</i>
<i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i>	<i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i>
<i>Phone: 949.951.2665</i>	<i>Тел.: 949.951.2665</i>
<i>Fax: 949.951.3539</i>	<i>Факс: 949.951.3539</i>
www.monobind.com	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

