НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЦИРКУЛЮЮЧОГО ТРОПОНІНУ-І

3825-300, Troponin-I (cTnI) Test System

Каталог. №: ***3825-300*** *Методика від* ***01-01-2019***
Кількість ***: 96*** *Версія* ***4***
Виробник ***: Monobind Inc., (США)***

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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ
Кількісне визначення концентрацій циркулюючого Тропоніну-І в сироватці людини з допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричний.

2.0 ВСТУП *(Див. оригінал інструкції).*

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ
Метод сендвіч-рівноваги (ТИП 2):
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 Інсуліну.
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:

$$^{Enz}Ab + Ag_{cTnI} + Ab_{(well)} \underset{k_{-a}}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} {}^{Enz}Ab - Ag_{cTnI} - Ab_{(well)}$$

$Ab_{(well)}$ = Антитіла, нанесені в лунку (надлишкова кількість)
Ag_{cTnI} = Нативний антиген (змінна кількість)
^{Enz}Ab = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)
$^{Enz}Ab - Ag_{cTnI} - Ab_{(well)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло
k_a = Константа швидкості асоціації
k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

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 Тропоніну-І – 1.0 мл/флакон (ліофілізовані)
6 флаконів референтної сироватки для антигена Тропоніну-І з концентраціями 0(**A**), 0.4(**B**), 1.25(**C**), 2.5(**D**), 7.5(**E**) і 20(**F**) нг/мл. Консервант було додано. ***Розвести кожен флакон з 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води.***
Відновлені калібратори стабільні протягом 24 годин при температурі 2-8 °C. Для того, щоб зберігати протягом більш тривалого періоду часу аліквотувати відновлені калібратори в кріопробірках і зберігати при температурі -20 °C. ***НЕ ЗАМОРОЖУВАТИ-РОЗМОРОЖУВАТИ БІЛЬШ НІЖ ОДИН РАЗ.***
Примітка: Калібратори, засновані на сироватці людини, були відкалібровані при використанні еталонного препарату NIST для cTnI # 2921.

B. Ферментний Реагент Тропоніну-І – 13 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить фермент-мічене очищене антитіло і моноклональное мишаче IgG в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

C. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон
Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

E. Субстрат А – 7.0 мл/флакон
Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C**.**

F. Субстрат В – 7.0 мл/флакон
Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Стоп-розчин – 8.0 мл/флакон
Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

H. Інструкція

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
Примітка 2: Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C. Стабільність набору та компонентів зазначена на етикетці.
Примітка 3: Вищезазначені реагенти призначені для одного 96-лункового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором
1. Мікродозатори на 25 і 100 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5% (опційно).
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова 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, 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 мають бути кров, сироватка різних типів, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

Перекладач Зеленська Т. І.

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 дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при температурі 2-30 °C до 60 днів.
2. **Робочий Субстратний розчин** – Стабільний протягом 1 року
   Змішайте Субстрати, вилivши 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.

Зауваження 1: *Не використовуйте робочий 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, стандарти і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).
Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим фахівцем

1. Виберіть необхідну кількість лунок для калібратора, контролю та зразка пацієнта для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
2. Додайте піпеткою по 25 мкл калібраторів, контролів та зразків у відповідні лунки.
3. Додайте 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту Тропоніну-I. 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.
4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.
5. Інкубувати протягом 15 хвилин при температурі 20-27 ^{o}C.
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
7. Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще 4 (чотири) рази (загальна кількість циклів промивки - 5). 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 вміст і повторіть ще 4 рази.
8. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів").

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). 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 ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Тропоніну-I в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Тропоніну-I в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації Тропоніну-I в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.322 перетинає стандартну криву при 3.61 нг/мл (див. мал.1).

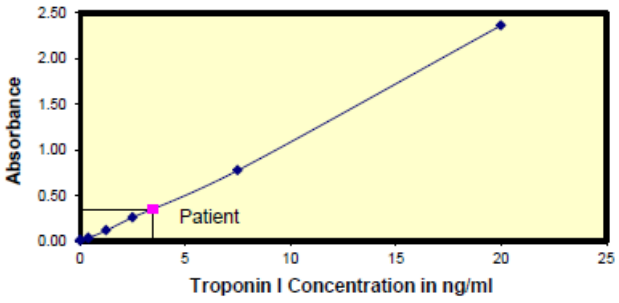
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для обробки даних, призначене для аналізів ELISA, може також використовуватися для обробки даних. У разі використання такого програмного забезпечення слід перевірити достовірність програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація нг/мл
Калібратор A	A1	0.007	0.007	0
	B1	0.008		
Калібратор B	C1	0.035	0.037	0.4
	D1	0.040		
Калібратор C	E1	0.112	0.116	1.25
	F1	0.119		
Калібратор D	G1	0.257	0.260	2.5
	H1	0.264		
Калібратор E	A2	0.777	0.777	7.5
	B2	0.776		
Калібратор F	C2	2.362	2.365	20
	D2	2.368		
Контроль 1	E2	0.050	0.051	0.43
	F2	0.051		
Контроль 2	G2	1.256	1.245	12.75
	H2	1.233		
Пацієнт	A3	0.320	0.322	3.61
	B3	0.324		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Figure 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність (OD) калібратора «A» має бути ≤ 0.07.
2. Оптична щільність Калібратора «F» повинна бути ≥ 1.3
3. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS та форму аналізу ризику для цього продукту доступна 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.

Перекладач Зеленська Т. І.

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 Тропоніну-І вище 30 нг/мл можуть бути розведені з нульовим калібратором, вільною від Тропоніну-І 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, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

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® ELISA 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 відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення Тропоніну-І різні в плазмі й сироватці. Крім того, на зразки плазми може впливати консервант, який використовується. Наприклад, гепарин практично не впливає на результати, але оксалат і ЕДТА мають значний ефект. Бажано використовувати зразки сироватки, в яких було швидко відділено еритроцити.

На підставі клінічних даних, зібраних Monobind відповідно до опублікованої літературі наступні діапазони були призначені. **Ці діапазони повинні використовуватися тільки як рекомендації:**

Дорослі (нормальні значення)	≤ 0.4 нг/мл

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватись на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору Тропоніну-І 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)

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Пул 1	20	0.44	0.014	3.3
Пул 2	20	3.55	0.072	2.0
Пул 3	20	12.75	0.311	2.4

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами* (нг/мл)

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	0.48	0.038	7.9
Рівень 2	10	3.68	0.242	6.6
Рівень 3	10	13.56	0.745	5.5

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях на протязі 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) була визначена шляхом визначення LoB і LoD. LoB становить 0.0639 н /мл, а LoD – 0.0759 нг/мл.

14.3 Точність

Тест-систему ІФА Тропоніну-І AccuBind® порівнювали з радіо імунним аналізом. Біологічні зразки населення були використані (симптоматичного і безсимптомного). (Значення варіювалися від N/D – 18.1 нг/мл). Загальна кількість таких зразків була 151.

Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Monobind (y)	3.04	Y=0.3500+0.9266 (X)	0.950
Референсний (x)	2.92		

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

14.4 Специфічність

Перехресна реактивність методу ІФА Тропонін-І з вибраними речовинами оцінювалася шляхом додавання інтерферуючих компонентів в матрицю сироватки у дуже високій концентрації.

SUBSTANCE	Cross Reactivity
Hemoglobin	ND
CK-MB	ND
TnT	ND
FABP	ND

Наявність ліпемії (25 мг/мл), гемоглобін (4.0 мг/мл) і білірубін (2.5 мг/мл) не впливають на точність аналізу.

14.5 Хук-Ефект

Зразки сироватки крові людини насичені cTnI в концентраціях до 10,000 нг/мл, не демонструють ніякого хук-ефекту з системою аналізу ІФА cTni AccuBind™.

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

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com

Перекладач Зеленська Т. І.

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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»

Перекладач Зеленська Т. І.