

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФОЛАТУ МЕТОДОМ ІФА

## Folate Test System

Кат. №: 7525-300А

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 2



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

### 1.0 ВВЕДЕННЯ

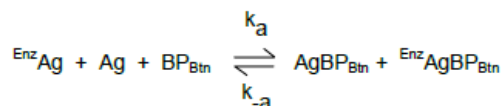
**Призначення:** Кількісне визначення концентрації фолату в сироватці за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, Колориметричний.

### 2.0 РЕЗЮМЕ І ОПИС ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### 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 декантації 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 лунки

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.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

#### Матеріали, що постачаються:

#### А. Калібратори Фолату - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референтної альбумінової сироватки людини з концентраціями Фолату 0 (А), 1.0 (В), 2.5 (С), 5.0 (D), 10.0 (Е) і 25.0 (F) в нг/мл (ng/ml). Містять консервант. Зберігати при 2-8 °С (°C).

**Зауваження:** Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні високо очищеного препарату N-метилтетрагідрофолату.

#### В. Ферментний реагент Фолату - 7.0 мл (мл)/флакон

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

#### С. Біотиновий реагент Фолату -7.0 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить кон'югат біотинильованого очищеного фолату зі зв'язуючим білком в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С (°C).

#### Д. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

#### Е. Концентрат розчину для промивання - 20.0 мл (мл)/флакон

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

#### Ф. Реагент субстрату - 12.0 мл (мл)/флакон

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

#### Г. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5 М (M)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Зберігати при 2-8 °С (°C).

#### Н. Вивільнюючий агент - 14.0 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну базу (гідроксид натрію) і цианід калію. Зберігати при 2-8 °С (°C).

#### І. Стабілізуючий агент - 0.7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить розчин трис (2-карбоксіетил) фосфін (ТСЕР). Зберігати при температурі 2-8 °С (°C).

#### J. Нейтралізуючий буфер - 7.0 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить буфер, який знижує рН екстракції зразка. Зберігати при температурі 2-8 °С (°C).

#### К. 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 °С (°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. Мікродозатори на 50 і 100 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
3. Регульовані (200-1000 мкл (μl)) дозатори для кон'югату.
4. Скляні пробірки для підготовки калібратора, контролю та зразка пацієнта.
5. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
6. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки 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 відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

## 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразком повинна бути сироватка крові за типом; дотримуйтесь звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для точного порівняння, щоб встановити нормальні значення, зразок сироватки повинен бути отриманий натщесерце вранці. Кров слід забирати в пробірки для венепункції з червоним ковпачком (з або без добавок гелю). Дайте крові згорнутися 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 забирати зразок, поки не пройнуть, щонайменше, 8 годин після останнього введення біотину, бажано протягом ночі, щоб забезпечити пробу натщесерце.

Зразки можуть зберігатися в холодильнику при 2-8 °C (°C) протягом максимум двох (2) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, то вони можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 7 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування/розморожування. При аналізі в дублях необхідно 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) зразка.

## 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 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (мл) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) 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 (мл) (4000 мкл (μl)), додати 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) стабілізуючого агента до 3.9 мл (мл) (3900 мкл (μl)) вивільнюючого агента.

### 3. ЕКСТРАКЦІЯ ЗРАЗКА (Див. Примітку 3)

Підготувати достатню кількість пробірок для підготовки всіх зразків пацієнтів, контролів і калібраторів. Розлити 0.10 мл (мл) (100 мкл (μl)) всіх зразків в окремі пробірки. Піпетувати 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) підготовленого екстракційного агента в кожну пробірку, струшуючи (див. примітку 3) після кожного додавання. Дозволити реакції протікати протягом 15 хвилин. Наприкінці 15 хвилин додати 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) нейтралізуючого буфера, перемішати (див. Примітку 3). Після додавання нейтралізуючого буфера і перемішування, почекати ще 5 хвилин до закінчення реакції перед внесенням в лунки.

**Примітка 1:** Не використовуйте субстрат, якщо він має блакитне забарвлення.

**Примітка 2:** Не використовуйте реагенти, які забруднені або є рід бактерій.

**Примітка 3:** Використання мульти (3) сенсорного вортекса рекомендується.

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

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

\*\*Процедура тестування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом\*\*

1. Підготуйте всі зразки відповідно до процедури «Екстракція зразка» в розділі «8.0 Підготовка реагентів»; важливо почекати 5 хвилин перед початком аналізу, щоб дозволити реакції нейтралізації завершитися (див. вище).

2. 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 (°C).
3. Додайте піпеткою по 50 мкл (μl) відповідних екстрагованих фолатного калібратора, контролю або зразка у відповідні лунки.
4. Додайте по 50 мкл (μl) Ферментного реагенту Фолату в кожну лунку.
5. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
6. Додати 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) Біотинового Реагенту Фолату в усі лунки.
7. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
8. Накрийте та інкубуйте 45 хвилин при кімнатній температурі.
9. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
10. 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.
11. 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

12. Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
13. 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.
14. 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:** Розвести зразки з концентраціями вище 25 нг/мл (ng/ml) 1:5 і Калібратор фолієвої кислоти «0» нг/мл (ng/ml) і знову проаналізувати.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Фолату 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 Фолату в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Для визначення концентрації фолієвої кислоти в невідомих зразках знайти середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину з кривою і концентрацію (в нг/мл (ng/ml)) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомих зразків можуть бути усереднені). У наступному прикладі, середня абсорбція (1.021) перетинає криву в точці 11.9 нг/мл (ng/ml) концентрації фолієвої кислоти (малюнок 1).

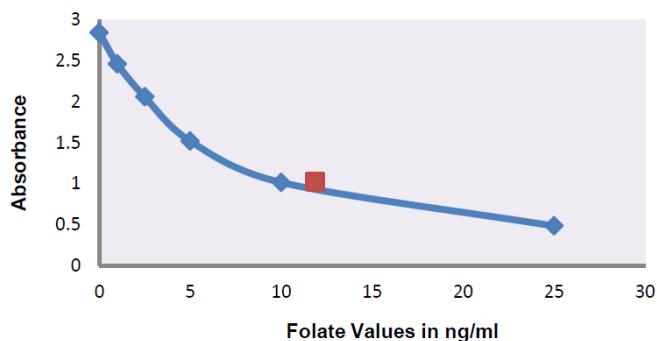
**Примітка:** Може бути використане програмне забезпечення для обробки даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

\*Дані, таблиці та рисунки нижче тільки для прикладу. Не використовуйте їх для розрахунку результатів.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	2.812	2.839	0
	B1	2.865		
Калібратор В	C1	2.437	2.455	1
	D1	2.473		
Калібратор С	E1	2.058	2.055	2,5
	F1	2.051		
Калібратор	G1	1.542	1.518	5

<b>D</b>	H1	1.494		
<b>Калібратор E</b>	A2	1.003	1.015	10
	B2	1.027		
<b>Калібратор F</b>	C2	0.453	0.485	25
	D2	0.516		
<b>Зразок</b>	E2	1.004	1.021	11.9
	F2	1.038		



Absorbance - Абсорбція  
Folate Values in ng/ml - Значення Фолату в нг/мл

### 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора 0 нг/мл (ng/ml)  $\geq 1.8$ .
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 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](mailto:Monobind@monobind.com).

#### 12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим 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 випробування системи були розроблені для максимального усунення інтерференції; однак, потенціальна взаємодія

між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, можуть бути проблемою для всіх видів імуноаналізів. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням, історією пацієнта і всіма іншими клінічними даними.

4. Для отримання дійсних результатів адекватні 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 тестової системи Folate AccuBind® ELISA Test System детально викладені в таблиці 1.

Таблиця 1

#### Очікувані значення для Фолієвої Кислоти

<b>Дорослі (нормальні значення)</b>	> 3.0 нг/мл (ng/ml)
-------------------------------------	---------------------

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 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 (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	24	3.72	0.31	8.3
Пул 2	24	9.26	0.53	5.7
Пул 3	24	13.71	0.83	6.1

ТАБЛИЦЯ 3

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

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	12	3.32	0.32	9.6
Пул 2	12	8.85	0.68	7.7
Пул 3	12	12.85	1.15	8.9

\*вимірювання проводились в дублях протягом 10 днів.

#### 14.2 Чутливість

Чутливість методу склала 0.52 нг/мл (ng/ml). Чутливість (межа визначення) визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту 0 нг/мл (ng/ml) плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

#### 14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з затвердженим референтним методом для Фолату. Використовувалися зразки сироваток зі значеннями в діапазоні 3.2 нг/мл (ng/ml) - 13.7 нг/мл (ng/ml). Загальна кількість зразків склала 30. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

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

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

Перехресну реактивність даного методу визначення Фолату з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироваткової матриці в різних концентраціях.

Речовина	Перехресна реактивність
Білірубін	Не визначається
Біотин	Не визначається
Ліпемія	Не визначається



#### ВИРОБНИК

MONOBIND INC.  
100 North Pointe Dr.  
Lake Forest, CA 92630 - USA  
Phone: 949.951.2665  
Fax: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)

МОНОБАЙНД ІНК  
100 Норд Поїнт Драйв  
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США  
Тел.: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

