

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЕСТРОНУ МЕТОДОМ ІФА

Estrone (E1) Test System

Кат. №: 10325-300A

Дата випуску інструкції: 21-11-2018

Версія: 0



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 естроноу у сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

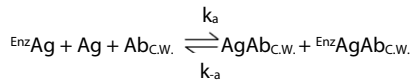
3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (ТИП 5):

Основні реагенти, необхідні для твердофазного імуноферментного аналізу, включають іммобілізоване антитіло, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген.

При змішуванні іммобілізованого антитіла, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція конкуренції між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість нерозчинених сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{C.W.}}$ = Моноспецифічне іммобілізоване антитіло (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = Кон'югат Фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{C.W.}}$ = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{C.W.}}$ = Комплекс Кон'югат Фермент-антиген – Антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_{-a}$ = Постійна рівноваги

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відокремлюється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних референсних сироваток відомих концентрацій антигена, можна побудувати криву реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію невідомого антигена.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Естроноу - 1 мл (мл)/флакон

Шість (6) флаконів референсної сироватки для естрадіолу в концентраціях 0 (A), 15 (B), 30 (C), 100 (D), 300 (E), 1000 (F) у пг/мл (pg/ml). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Додано консервант. Калібратори можна виразити в молярних концентраціях (пмоль/л (pmol/l)), помноживши на 3.70.

Наприклад: 1 пг/мл (pg/ml) x 3.70 = 3.70 пмоль/л (pmol/l)

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

Один (1) флакон, що містить кон'югат естроноу (аналог)-пероксидаза хроноу (HRP) у білок-стабілізуючій матриці з барвником. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Пластина, покрита антитілами до Естроноу - 96 лунок

Один 96-луноковий мікропланшет, покрита естроноу специфічним кролячим IgG і упакований в алюмінієвий пакет з сушильним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Концентрат промивного розчину - 20 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить ПАР у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

E. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить у буфері тетраметилбензидин (ТМБ) та перекис водню (H₂O₂). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

F. Стоп-Розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5 M (M) H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

G. Інструкція

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

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

Примітка 3: Вищевказані компоненти призначені для одного 96-лунокового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор зі здатністю подавати об'єми 0.25 мл (мл) (25 мкл (μl)) та 0.50 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. Диспенсер(и) регульованого об'єму від 0.050 до 1.0 мл (мл) (50-1000 мкл (μl)) для кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
9. Таймер.
10. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані 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, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразки повинні представляти собою кров, сироватку або гепаранізовану плазму за типом та отримані із звичайними запобіжними заходами при відборі зразків венепункцією. Для точного порівняння для встановлення нормальних значень слід отримати зразки сироватки вранці натщесерце. Кров слід збирати у пробірки для венепункції з червоним ковпачком (з добавками гелю або без них) або вакуумні пробірки, що містять гепарин, для зразків плазми. Дайте крові згорнутися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C (°C) протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу в дублях потрібно 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях у низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу результатів аналізу. Ці контроли 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 РЕАГЕНТУ

1. Промивний розчин

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

Примітка: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироватковий референсний матеріал і контроль повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

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

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).
- Внесіть 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) відповідного сироваткового референсного матеріалу, контролю або зразка у призначену лунку.
- Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) ферментного реагенту Естрону в кожен лунку.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Накрийте кришкою та інкубуйте протягом 45 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ «Підготовка реагенту») 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, наповніть кожен лунку до верху (унікайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) робочого розчину субстрату у всі лунки (див. Розділ «Підготовка реагенту»). Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) стоп-розчину в кожен лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
- 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, у яких підозрюють концентрацію вище 1000 пг/мл (pg/ml) 1:5 та 1:10, калібратором Естрону «0» пг/мл (pg/ml) або пулами сироватки пацієнтів чоловічої статі з відомим низьким значенням естрону.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

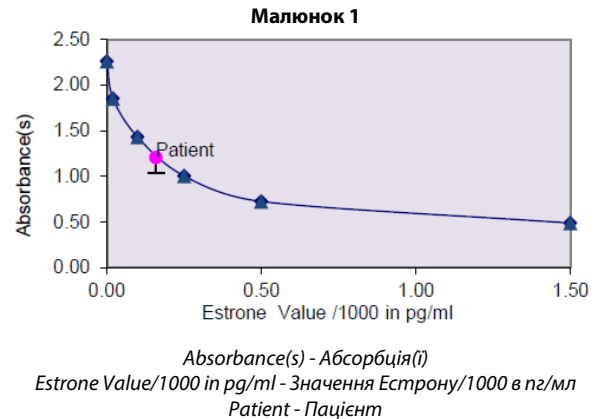
Для визначення концентрації Естрону в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації Естрону в пг/мл (pg/ml) на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію Естрону для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у пг/мл (pg/ml)) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (1.323) перетинає криву реакції на дозу при концентрації Естрону 43.1 пг/мл (pg/ml) (див. Малюнок 1).

Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

I.D. зразка	Номер лунки	Abs (A)	Середнє Abs (B)	Значення (пг/мл (pg/ml))
Калібратор А	A1	2.206	2.169	0
	B1	2.136		
Калібратор В	C1	1.866	1.866	15
	D1	1.866		
Калібратор С	E1	1.503	1.516	30
	F1	1.530		
Калібратор D	G1	0.890	0.903	100
	H1	0.917		
Калібратор Е	A2	0.502	0.498	300
	B2	0.495		
Калібратор F	C2	0.293	0.299	1000
	D2	0.306		
Пацієнт 1	E2	1.325	1.323	43.1
	F2	1.320		

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.



Примітка: Помножте горизонтальні значення на 1000, щоб перетворити у пг/мл (pg/ml).

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Абсорбція (OD) калібатора 0 пг/мл (pg/ml) повинна бути > 1.3.
- 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

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- 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 - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування 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 проводитись досвідченими професіоналами.

2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscatto LM, Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. Для дійсних результатів випробувань адекватні засоби контролю та інші параметри повинні відповідати переліченим діапазонам та вимогам до аналізу.
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 ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Відповідно до встановлених контрольних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції та жінок під час гестації, очікувані діапазони для тестової системи Estrone AccuBind® IFA детально описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тестової системи Естрадіолу

	Середнє	Діапазон
Жінки	-	-
Вік 20-49	20	6-400
Вік 50-69	10	НВ-26
Вік 70+	19	НВ-104
Дорослі чоловіки	21	НВ-54

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, сукупності тестованих та 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 власний діапазон значень, використовуючи метод з корінним населенням до району, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність тест-системи для вимірювання Естрону AccuBind® IFA в аналізі та між аналізами була визначена за допомогою аналізів на шести різних рівнях контрольних пулованих сироваток. Кількість, середні значення, середнє відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблицях 2 та 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Дані точності для тестової системи визначення Естрону

	Середнє значення	Точність в аналізі		Загальна точність N=80	
	(пг/мл (pg/ml))	SD	CV%	SD	CV%
Зразок 1	23.508	1.36	5.74	2.64	11.11
Зразок 2	38.114	1.22	3.03	4.59	11.39
Зразок 3	103.239	6.14	6.25	9.61	9.79
Зразок 4	219.433	4.96	2.18	11.81	5.19
Зразок 5	606.769	20.31	3.47	35.55	6.07
Зразок 6	777.688	28.08	3.84	54.69	7.47

*Як було виміряно в сорока експериментах в дублях протягом двадцятиденного періоду.

14.2 Чутливість

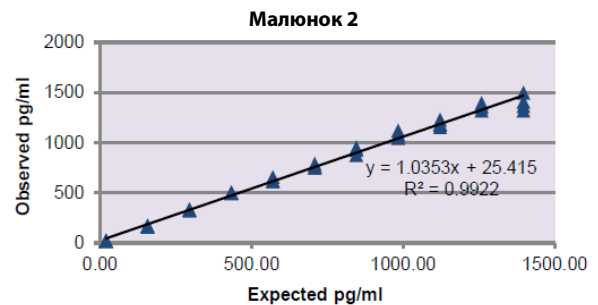
Тест-система Естрон AccuBind® IFA має LoB 6.03 пг/мл (pg/ml) і LoD 10.68 пг/мл (pg/ml).

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність тест-системи Естрон AccuBind® IFA була випробувана шляхом розведення зразків сироватки людини, що містять високий рівень естрону (~1400 пг/мл (pg/ml)), з сироватковим референсним матеріалом 0 пг/мл (pg/ml). Було визначено, що система має чудову лінійність до 1400 пг/мл (pg/ml) з відхиленням 1.035 та коефіцієнтом кореляції 0.9922.

Очікувані значення порівнювали із отриманими концентраціями зразків та відобразили на малюнку 2.



14.3.2 Відновлення

Відновлення тест-системи Естрон AccuBind® IFA було розраховано для п'яти зразків пацієнтів із додаванням естрону 25, 50, 250, 500 та 800 пг/мл (pg/ml). Було визначено, що відновлення були в межах 15% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.3.3 Порівняння методів

Тест-система Естрон AccuBind® IFA була порівняна з хемілюмінесцентним аналізом. Використовували біологічні зразки з популяцій із низьким, нормальним та відносно високим рівнем альдостерону (Значення коливались від 10 пг/мл (pg/ml) до 850 пг/мл (pg/ml)). Загальна кількість таких зразків становила 68. Рівняння найменшої квадратної регресії та коефіцієнт кореляції були розраховані для цього IFA естрону порівняно з еталонним методом. Отримані дані відображаються в таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 3

Метод	Середнє (x)	Аналіз найменших квадратних регресій	Коефіцієнт кореляції
Monobind (y)	98.85	$y = 0.855x + 9.063$	0.988
Референсний (x)	105.0		

Лише незначні розміри зміщення між цим методом та референсним методом вказуються на близькість середніх значень. Рівняння найменшої квадратичної регресії та коефіцієнт кореляції вказує на чудову узгодженість методу.

14.4 Специфічність

% Перехресної реактивності антитіла естрадіолу до вибраних речовин оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували,

отримуючи співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою естрадіолу, необхідною для витіснення тієї ж кількості міченого аналога.

Субстанція	Перехресна реактивність
Естрадіол 17β	0.8282
Естрадіол 17α	0.2107
Естріол	0.0347
Прогестерон	0.0056
ДГЕА сульфат	0.0017



ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i> 100 North Pointe Dr. Lake Forest, CA 92630 - USA Phone: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i> 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

