

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СЕКС-ГОРМОН- ЗВ'ЯЗУЮЧОГО ГЛОБУЛІНУ (SHBG) В СИРОВАТЦІ ТА ГЕПАРИНОВІЙ ПЛАЗМІ

2043-6, SHBG

Каталог. №: 2043-6

Методика від 03-22-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	Sex-hormone-binding globulin
Метод	Імуносорбентний аналіз з ферментною міткою
Принцип	Конкурентний кон'югований пероксидазою ІФА
Діапазон визначення	0.77-260 нмоль/л
Зразок	10 мкл сироватки
Специфічність	100 %
Чутливість	0.77 нмоль/л
Загальний час	~ 60 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців

* Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийняті до уваги.

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

DAI SHBG ELISA є ферментним імуноаналізом для визначення SHBG в сироватці і гепариновій плазмі.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

DAI SHBG ІФА являє собою імуноферментний аналіз твердої фази (ELISA), заснований на принципі сендвіча.

Лунки покриті моноклональними антитілами миші, спрямованими проти унікального антигенного сайту з молекулами SHBG. Аліквота проби, що містить ендогенний SHBG, інкубується в лунці. Після промивання додається ферментний кон'югат, який являє собою моноклональне антитіло анти-SHBG, кон'юговане з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається. Кількість зв'язаної пероксидази прямо пропорційна концентрації SHBG у зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність забарвлення пропорційна до концентрації SHBG у зразку.

ПРОЦЕДУРНІ ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений тільки для дослідницьких цілей. Тільки для професійного використання.
- Всі реагенти даного набору, які містять сироватку або плазму людини, були перевірені і підтверджені негативними на ВІЛ 1,2, HBsAg і HCV. Тим не менше, всі реагенти слід розглядати як потенційно інфіковані при роботі з ними та утилізації.
- Перед початком аналізу прочитайте інструкцію уважно і повністю. Використовуйте чинну редакцію інструкції, що поставляється в наборі. Впевніться, що все зрозуміло.
- Мікропланшет складається зі смужок, що відділяються. Невикористані лунки слід зберігати при температурі 2 - 8 °C у герметичній упаковці і використовувати в рамці, яка надається.
- Піпетування зразків і реагентів проводити якомога швидше і в тій же послідовності для кожного кроку.
- Використовувати ємності тільки для одного реагенту. Це особливо стосується ємностей для субстрату. Використовуючи пробірку для дозування розчину субстрату, яка раніше використовувалась для кон'югату, може призвести до зміни кольору. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
- Змішувати вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
- Не дозволяйте лункам пересихати під час аналізу, додавати реагенти негайно після закінчення промивки.

- Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °C) до початку тесту. Температура впливає на результати поглинання. Проте, це не вплине на результати.
- Ніколи не піпетувати ротом і уникати контакту реагентів і зразків зі шкірою та слизовими оболонками.
- Не палити, не їсти, не пити і не застосовувати косметику в місцях роботи зі зразками або реагентами набору.
- Використовувати одноразові рукавички при роботі із зразками і реагентами. Бактеріальне забруднення реагентів або зразків може призвести до помилкових результатів.
- Поводитись з реагентами відповідно до процедур, визначених відповідними правилами біологічної безпеки.
- Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Всі зазначені обсяги повинні бути виконані у відповідності з протоколом. Оптимальні результати тестування можна отримати тільки при використанні каліброваних піпеток та мікропланшетного зчитувача.
- Не змішуйте компоненти з наборів різних партій. Рекомендується не міняти місцями лунки різних пластин навіть з тієї ж партії. Набори могли транспортуватися в різних умовах і характеристики зв'язування пластин можуть привести до дещо інших результатів.
- Уникати контакту із стоп-розчином, що містить 0.5 M H₂SO₄. Це може призвести до опіків шкіри.
- Деякі реагенти можуть містити Проклін, BND і/або MIT в якості консервантів. У разі попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
- Субстрат ТМВ подразнює шкіру і слизову оболонку. У разі можливого контакту, промийте очі великою кількістю води і шкіру з милом і великою кількістю води. Вимити забруднені об'єкти до їх повторного використання.
- Хімічні речовини і приготвлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи згідно з національним керівництвом біологічної безпеки або регулювання.
- Щодо інформації про небезпечні речовини, які входять у набір, дивись Паспорт безпеки. Паспорт безпеки для даного продукту є доступний за запитом безпосередньо від DAI.

РЕАГЕНТИ

Реагенти, що постачаються

- Мікролунки**, 12 x 8 (відокремлюваних) смужок, 96 лунок; Лунки покриті антитілами анти-SHBG (моноклональні).
- Стандарт (Стандарт 0-4)**, 5 флаконів, 0.5 мл, готові до використання; Концентрації: 0 - 4 - 16 - 65 - 260 нмоль/л Стандарти відкалібровані до людського стандарту SHBG, встановленого BOO3 (NIBSC 08 /266) Містять консерванти.
- Контроль**, 1 флакон, 0.5 мл кожен, готовий до використання; Значення і діапазони вказані на етикетці флакона або у QC-листі. Містять консервант.
- Робочий Буфер**, 1 флакон, 80 мл, готовий до використання. Містять консервант.
- Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 14 мл готовий до використання, Анти-SHBG антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому; Містять консервант.
- Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМБ).
- Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Містить 0.5 M H₂SO₄, Уникати контакту зі стоп-розчином. Це може викликати роздратування шкіри і опіки.
- Розчин для промивання**, 1 флакон, 25 мл (40X концентрований) Дивись розділ "Підготовка реагентів"

Необхідні матеріали, що не входять до набору

- Мікропланшетний зчитувач (450±10 нм)
- Калібровані Мікропіпетки з різною точністю
- Фільтрувальний папір
- Дистильована або деіонізована вода
- Пробірки для розведення зразка/стандарту
- Таймер
- Напівлогарифмічний міліметровий папір або програмне забезпечення для обробки даних

Умови зберігання

- При зберіганні при температурі 2-8 °C у закритому вигляді, реагенти зберігають активність до закінчення терміну

придатності. Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності.

- Відкриті реагенти повинні зберігатися при 2-8 °C. Лунки слід зберігати при температурі 2-8 °C.
- Після відкриття набору реагенти зберігають активність протягом двох місяців, якщо зберігати, як описано вище.

Підготовка реагентів

Привести всі реагенти та необхідну кількість смужок до кімнатної температури перед використанням.

Розчин для промивання

- Додати деіонізованої води до 40X концентрованої розчину для промивання.
- Розвести 25 мл концентрованої розчину для промивання з 975 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1000 мл.
- *Розведений промивний розчин стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.*

Утилізація набору

Утилізація набору повинна проводитись у відповідності з національними регулюваннями. Спеціальна інформація для даного продукту наведена в Паспорті безпеки.

Пошкоджені набори

У випадку серйозного пошкодження набору або його компонентів, DAI повинен бути повідомлений у письмовій формі не пізніше, ніж через тиждень після отримання набору. Пошкоджені компоненти не повинні використовуватися для тестового запуску. Вони повинні бути збережені, поки остаточне рішення не буде знайдено. Після цього вони повинні бути утилізовані відповідно до приписів компетентних служб.

ЗБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Сироватка або гепаринова плазма можуть бути використані в даному аналізі.
- EDTA - плазма може дати гірші результати.
- Не використовуйте гемолітичні, жовтяничні або ліпемічні зразки.
- Зверніть увагу: Зразки, що містять азид натрію, не повинні використовуватися в аналізі.

1. Забір зразків

Сироватка:

Провести забір крові з вени, дати їй згорнутися, і відділити сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не розпочинати центрифугування до повного згортання. Пацієнтам, які отримують антикоагулянти, може знадобитись більше часу на згортання.

Плазма:

Цільну кров зібрати в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт і центрифугувати відразу після збору.

2. Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і можуть зберігатися до 2 днів при +2-8 °C до проведення аналізу. Зразки, призначені для більш тривалого зберігання, слід заморозити при -20 °C до аналізу. Талі зразки слід кілька разів перевернути перед тестуванням.

3. Розведення зразків

Якщо у вихідному аналізі зразки мають концентрацію, вищу за самий високий стандарт, зразки можна розбавити Робочим Буфером і знову проаналізувати, як описано в Процедурі аналізу. Для обчислення концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

Приклад:

- розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл аналітичного буфера (ретельно перемішати)
- розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 10 мкл буфера для аналізу (ретельно перемішати).

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Загальні зауваження

- Всі реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури перед використанням. Всі реагенти повинні бути перемішані без утворення піни.
- Після того, як тест був запущений, всі кроки повинні бути завершені без перерв.
- Використовувати нові одноразові наконечники для кожного стандарту, контролю або зразка для уникнення перехресного забруднення.
- Абсорбція - це функція інкубаційного часу і температури. Перед початком аналізу рекомендується підготувати всі реагенти, зняти кришки, встановити лунки в тримачі і т.д. Це забезпечить

рівномірний розподіл часу піпетування для кожного кроку без перерви.

- Як правило, ферментативна реакція лінійно пропорційна часу і температурі.

2. Процедура

Кожен прогін повинен включати стандартну криву.

1. Встановити необхідну кількість лунок в рамці тримача.
2. **Розвести кожен стандарт, контроль та зразок 1:20** з Буфером для аналізу (1 частина стандарту/контролю/зразка + 19 частин буфера для аналізу)
Приклад: 10 мкл стандарту + 190 мкл аналітичного буфера
3. Додати **100 мкл Робочого буфера** в кожну лунку.
4. Внести **25 мкл** кожного **розведеного стандарту, контролю і зразка новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки. Ретельно перемішати протягом 10 секунд. Важливо мати повне перемішування в цьому кроці.
5. Інкубувати протягом **30 хвилин** при кімнатній температурі.
6. Різко витрусити вміст лунок. Промити лунки **3 рази** розчином для промивання (300-400 мкл/лунку). Різко витрусити вміст лунок на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки рідини.
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання!
7. Внести **100 мкл ферментного кон'югату** в кожну лунку.
8. Інкубувати протягом **15 хвилин** при кімнатній температурі.
9. Різко витрусити вміст лунок. Промити лунки **3 рази** розчином для промивання (300-400 мкл на лунку). Різко витрусити вміст лунок на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки рідини.
10. Додати **100 мкл розчину субстрату** в кожну лунку.
11. Інкубувати протягом **12 хвилин** при температурі (20-25 °C), **8 хвилин** при КТ (26 °C та вище).
12. Зупинити реакцію додаванням **100 мкл стоп-розчину** в кожну лунку.
13. Визначити щільність (OD) в кожній лунці при **450±10 нм** за допомогою зчитувача. Рекомендується зчитати результати **в межах 10 хвилин** після додавання стоп-розчину.

3. Підрахунок результатів

1. Підрахувати середні значення абсорбції для кожного набору стандартів, контролей і зразків пацієнтів.
2. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію кожного стандарту проти його концентрації зі значенням абсорбції на вертикальній (Y) вісі і концентрацією на горизонтальній (X) вісі.
3. Використовуючи середнє значення абсорбції для кожного зразка визначити відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичний метод: результати в IFU були розраховані автоматично за допомогою 4 PL (4-параметричної логістики) кривої. 4-Параметрична Логістика є кращим методом. Інші методи можуть давати відмінні результати.
5. Концентрацію зразків можна зчитувати прямо зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж у самого високого стандарту, необхідно розводити або відмітити як 260 нмоль/л. Для обчислення концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

Приклад типової Стандартної кривої

Наступні дані призначені тільки для демонстрації і не можуть бути використані під час аналізу.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 nmol/L)	0.01
Standard 1 (4 nmol/L)	0.08
Standard 2 (16 nmol/L)	0.30
Standard 3 (65 nmol/L)	1.07
Standard 4 (260 nmol/L)	2.04

ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила власні нормальні і аномальні значення.

У дослідженні, проведеному зі зразками очевидно здорових дорослих, використовуючи DAI SHBG ELISA, наступні значення спостерігаються:

Population	N	SHBG nmol/L	
		Mean	range
Males	102	43	15-100
Females	44	62	15-120

Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийняті до уваги.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контролю використовувалися в кожній калібрувальній кривій. Статистично значуща кількість контролей має бути проаналізована для встановлення середніх значень і діапазонів, прийнятних для забезпечення належної продуктивності.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних і федеральних норм. Використання контрольних зразків рекомендується для забезпечення щоденних результатів достовірності. Використовуйте контролю для нормальних і патологічних рівнів.

Контролі та відповідні результати QC-лабораторії зазначені в сертифікаті контролю якості, вкладеному в набір. Величини, зазначені на аркуші QC, завжди ставляться до поточного лоту набору і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів. Крім того, рекомендується використовувати національні та міжнародні програми оцінки якості для того, щоб забезпечити точність результатів.

Застосовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень і тенденцій. Якщо результати аналізу не сходяться з встановленими прийнятними діапазонами контрольних матеріалів, результати аналізу вважаються недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: прилади для піпетування та підрахунку часу; фотометр, терміни придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації та промивання. Після перевірки вище зазначених елементів і не знаходячи помилки, зверніться до свого дистриб'ютора або безпосередньо до DAI.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу становить 0.77 - 260 нмоль/л.

Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Специфічність SHBG ELISA вивчали вимірюванням очевидної реакції SHBG, викликаній високим рівнем ТЗГ (тироксин зв'язуючий глобулін) і КЗГ (кортизол-зв'язуючий глобулін). Перехресна реакція не була виявлена при тестуванні до 500 мг/л ТЗГ і 500 мг/л КЗГ.

Чутливість

Аналітична чутливість була розрахована як середнє плюс два стандартних відхилення двадцяти (20) повторних аналізів 0 Стандарту і було встановлено, що чутливість становить 0.77 нмоль/л.

Точність

В аналізі

Взірець	n	Середнє (нмоль/л)	CV, %
1	16	10.3	9.0
2	16	44.0	5.4
3	16	76.1	4.0
4	16	109.6	5.3

Між аналізами

Взірець	n	Середнє (нмоль/л)	CV, %
1	16	9.8	8.0
2	16	44.9	3.0
3	16	73.4	5.3
4	16	106.8	3.1

Відновлення

Визначена кількість SHBG була додана в три сироватки пацієнта і кількості відновлені були виміряні. Результати показані в наступній таблиці.

Sample	Endogenous SHBG nmol/L	Added SHBG (total) nmol/L	Measured value SHBG (total) nmol/L	Measured value minus endogenous value (observed value) nmol/L	Recovery %
1	8.2	32	39.0	30.8	96
1	8.2	16	23.1	14.9	93
2	10.8	32	39.0	28.8	90
2	10.8	16	26.7	15.9	99
3	11.3	32	37.4	26.1	82
3	11.3	16	25.2	13.9	87

Лінійність

Три зразки сироватки розводили з Робочим Буфером 1:2, 1:4, 1:8. Значення SHBG аналізували, і результати були виправлені з використанням фактора розведення.

Результати цих розведень показані в наступній таблиці:

Sample	Undiluted SHBG nmol/L	At dilution 1:2	Recovery At dilution 1:4	At dilution 1:8
1	89	101	92	110
2	99	97	96	91
3	177	99	86	81

Обмеження використання

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу здійснюється з повним розумінням інструкції та з дотриманням належної лабораторної практики. Будь-яке неправильне поводження із зразками або модифікація цього тесту можуть вплинути на результати.

Інтерферуючі речовини

Гемоглобін, білірубін і Тригліцериди не впливають на результати аналізу.

Втручання наркотиків

До сьогоднішнього дня немає речовин (наркотиків), які нам відомі, що мають вплив на вимірювання SHBG у зразку.

Хук-ефект Високої дози

Ефект Високої дози не спостерігався в цьому тесті до 40000 нмоль/л SHBG.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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