

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ С-ПЕПТИДУ МЕТОДОМ ІФА

C-Peptide Test System

Кат. №: 2725-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 4



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цільове використання: Кількісне визначення концентрацій циркулюючих С-пептидів у сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

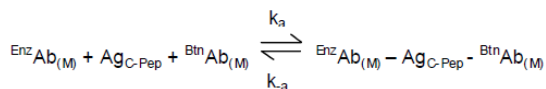
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

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 С-Пептиду.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген С-Пептиду, між С-Пептиду антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{BiotAb}_{(M)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{C-Пептиду}}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(M)}$ = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(M)} - \text{Ag}_{\text{C-Пептиду}} - \text{BiotAb}_{(M)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

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_{с.л.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований 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:

А. Калібратори С-Пептиду - 2.0 мл (мл)/флакон (ліофілізований)

6 флаконів референсного антигена С-Пептиду з концентраціями 0 (А), 0.2 (В), 1.0 (С), 2.0 (D), 5.0 (Е) і 10.0 (F) нг/мл (ng/ml). Розчиніть вміст флаконів в 2 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори слід негайно проаналізувати і можуть зберігатись протягом

8 годин при температурі 2-8 °С (°C), а потім утилізовані. Для зберігання протягом більш тривалого проміжку часу аликвотуйте розведені калібратори у крио-флакони і зберігайте при температурі -20 °С (°C) до 30 днів. Тільки для одноразового використання. Додано консервант.

Примітка: Калібратори на основі сироватки людини були калібровані за допомогою референсного препарату, який аналізували відповідно до 1-го IRR 84/510 ВОЗ.

В. Ферментний реагент С-Пептиду - 13 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ферментно-мічені афінно очищені моноклональні мишачі антитіла, біотинильований моноклональний мишачий IgG у буфері, барвник та консервант. Зберігати при 2-8 °С (°C).

С. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

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

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

Е. Субстрат А - 7.0 мл (мл)/флакон

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

Ф. Субстрат В - 7.0 мл (мл)/флакон

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

Г. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С (°C).

Н. 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 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гірше 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. Пластикові плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контейнер (и) для реагентів.
10. Дистильована або деіонізована вода.
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 місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати з пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (мг)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 2 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 0.100 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні низького, нормального та підвищеного діапазону для контролю ефективності аналізу. 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 (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин - Стабільний протягом одного року
Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакону 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 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, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

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

- Виберіть необхідну кількість лунок для калібратора, контролю і зразка пацієнта для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 50 мкл (µl) відповідних калібраторів, контролів і зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл (µl) Ферментного реагенту С-Пептиду у кожную лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 120 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C (°C)).
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- 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 кожную лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожную 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 кожную 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. 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 додайте реагенти в тому ж порядку, щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації С-Пептиду в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожную з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації С-Пептиду в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації С-Пептиду в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.433 перетинає стандартну криву при 1.03 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

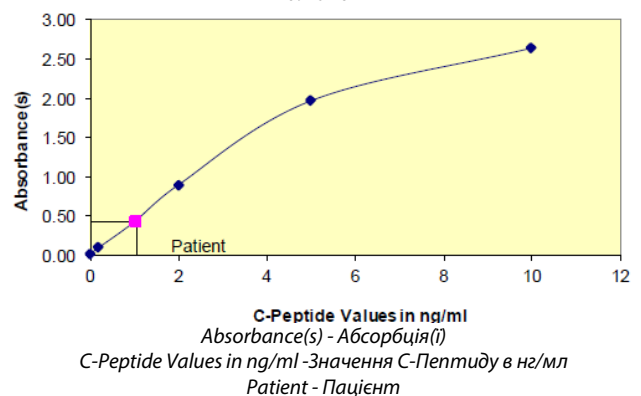
Примітка: Програмне забезпечення комп'ютера для обчислення даних, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

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

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	0.022	0.022	0
	B1	0.023		
Калібратор В	C1	0.097	0.103	0.2
	D1	0.107		
Калібратор С	E1	0.421	0.429	1
	F1	0.439		
Калібратор D	G1	0.889	0.901	2
	H1	0.910		
Калібратор E	A2	1.976	1.971	5
	B2	1.966		
Калібратор F	C2	2.717	2.643	10
	D2	2.570		
Контроль 1	E2	0.429	0.433	1.03
	F2	0.437		
Контроль 2	G2	1.861	1.887	4.64
	H2	1.913		
Зразок	A3	0.388	0.405	0.82
	B3	0.421		

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність калібратора А ≤ 0.7.
- Оптична щільність калібратора F ≥ 1.8.
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит 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.
- 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.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- 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.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів» Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- 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.
- 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

Значення С-Пептиду в плазмі вище, ніж в сироватці; таким чином, використанню сироватки надається перевага. У людей, які не страждають діабетом, значення С-пептиду натщесерце найбільш високі у людей, страждаючих ожирінням, а у тренуваних спортсменів - найнижчі. 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, що тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень. Ґрунтуючись на клінічних дослідженнях, проведених компанією Monobind, і відповідно до опублікованими даними, було отримано наступний діапазон нормальних значень. **Даний діапазон повинен бути використаний тільки як орієнтовний:**

Дорослі (нормальні значення)

0.7 - 1.9 нг/мл (ng/ml)

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору для визначення С-Пептиду 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 1 і 2.

ТАБЛИЦЯ 1

Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	20	1.43	0.11	7.7
Пул 2	20	5.07	0.46	9.0
Пул 3	20	7.81	0.73	9.3

ТАБЛИЦЯ 2

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

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	20	1.27	0.12	9.7
Пул 2	20	5.40	0.54	9.9
Пул 3	20	8.18	0.50	6.1

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

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. Чутливість методу склала 0.020 нг/мл (ng/ml).

14.3 Точність

Набір С-Пептид AccuBind ІФА порівнювався з затвердженим радіоімунним методом. Використовувалися зразки сироватки від симптоматичної та безсимптомної популяції (значення в діапазоні 0.2 нг/мл (ng/ml) - 11.8 нг/мл (ng/ml)). Загальна кількість зразків склала 124. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	1.068	Y = 0.2079 + 0.8036 (x)	0.962
Метод порівняння	1.066		

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 даного набору для визначення С-Пептиду з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироватці в різних концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози інтерферуючої речовини до дози С-Пептиду, необхідного для одержання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
С-Пептид	1.0000	--
Проінсулін	0.120	100 нг/мл (ng/ml)
Інсулін	Не визначається	1.0 мкМО/мл (μIU/ml)
Глюкагон	Не визначається	150 нг/мл (ng/ml)



ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поінт 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

