

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФОЛІКУЛОСТИМУЛЮЮЧОГО ГОРМОНУ МЕТОДОМ ІФА

Follicle Stimulating Hormone (FSH) Test System

Кат. №: 425-300А

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 співпасти.

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Використання за призначенням: Кількісне визначення концентрації Фолікулостимулюючого гормону в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуоферментного аналізу, колориметричного.

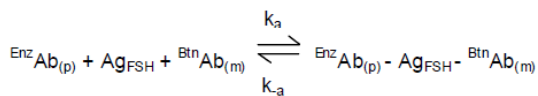
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуоферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, потрібні для імуоферментного аналізу, включають високо афінні та специфічні антитіла (мічені ферментом та іммобілізовані) з різними епітопами для розпізнавання, в надлишку, та нативний антиген. В даній процедурі відбувається зв'язування на поверхні лунок при взаємодії стрептавідину, яким покриті лунки та внесених ззовні біотинильованих моноклональних антитіл до ЛГ.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, фермент-мічених антитіл та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілами, без конкуренції та просторових забруднень, з формуванням розчинного сандвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється рівнянням:



$\text{EnzAb}_{(p)}$ = Біотинильоване моноклональне антитіло (надлишкова кількість)

Ag_{FSH} = нативний Антиген (змінна кількість)

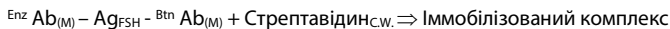
$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Фермент-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Сандвіч-комплекс Антиген-антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Одночасно комплекс відкладається на лунках через високо споріднену реакцію стрептавідину та біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{C.W.} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхню.

Після досягнення рівноваги фракція пов'язаних антитіл відділяється від незв'язаних фермент-антигену декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигена. 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 ФСГ - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсного матеріалу для антигена ФСГ з концентраціями 0(A), 5(B), 10(C), 25(D), 50(E) і 100(F) мМО/мл (mIU/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по Міжнародному стандарту WHO IRP 78/549.

B. Ферментний реагент ФСГ - 13 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить мічені ферментом антитіла, біотинильований моноклональний мишачий IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

C. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

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

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

E. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

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

F. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

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

G. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

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

H. 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 °C (°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) та 100 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. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. 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 за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити вибірку голодування.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 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 в низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу 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

Змішайте Субстрати, виливши 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 (°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)).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

1. Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного референсного калібратора сироватки, контролю та зразка пацієнта для аналізу в двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте піпеткою по 50 мкл (µl) референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл (µl) розчину Ферментного реагенту ФСГ у кожен лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
5. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
7. 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 кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожен 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

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен 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.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630

nm (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ФСГ 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 кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації ФСГ в мМО/мл (mIU/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації ФСГ в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.214 перетинає стандартну криву при 43.2 мМО/мл (mIU/ml) (див. мал.1)

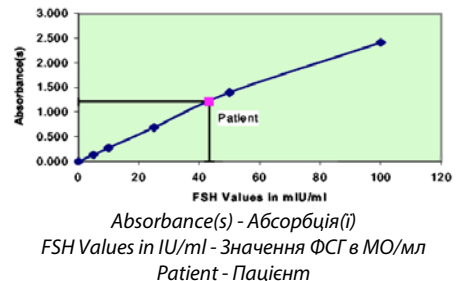
Примітка: Програмне забезпечення комп'ютера для обчислення даних, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

*Дані, представлені в Прикладі 1 та Рисунок 1, є лише ілюстративними і не повинні використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (мМО/мл (mIU/ml))
Калібратор А	A1	0.001	0.001	0
	B1	0.001		
Калібратор В	C1	0.146	0.139	5
	D1	0.133		
Калібратор С	E1	0.276	0.277	10
	F1	0.278		
Калібратор D	G1	0.680	0.689	25
	H1	0.698		
Калібратор Е	A2	1.444	1.399	50
	B2	1.354		
Калібратор F	C2	2.471	2.412	100
	D2	2.354		
Контроль 1	E2	0.162	0.157	5.6
	F2	0.152		
Контроль 2	G2	0.545	0.546	19.9
	H2	0.547		
Зразок	A3	1.173	1.214	43.2
	B3	1.255		

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора F має бути ≥ 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

- 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 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.
- 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 розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- ФСГ пригнічується естрогеном, але у жінки, яка приймає оральні контрацептиви, рівень може бути низьким або нормальним. Надмірна дієта та втрата ваги можуть призвести до низьких концентрацій гонадотропіну.
- ФСГ залежать від різних факторів, крім гомеостазу гіпофіза. Таким чином, одне визначення недостатньо для оцінки клінічного стану.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження дорослої нормальної популяції цим набором і отримані наступні результати.

Таблиця 1

Очікувані значення для тестової системи FSH Accubind® ІФА
(в мМО/мл (mIU/ml) 2-го IRP 78/549)

Жінки	
Фолікулярна фаза	3.0-12.0
Середина циклу	8.0-22.0
Лютеїнова фаза	2.0-12.0
Постменопауза	35.0-151.0
Чоловіки	
	1.0-14.0

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції «нормальних» людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, що тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цієї причини кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановленого виробником лише до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод з корінним населенням району, в якому знаходиться лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору ФСГ 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 (мМО/мл (mIU/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	5.0	0.25	5.4
Рівень 2	20	25.0	0.94	3.8
Рівень 3	20	40.6	1.64	4.0

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мМО/мл (mIU/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	4.7	0.42	9.0
Рівень 2	20	23.1	1.99	8.6
Рівень 3	20	37.8	3.2	8.4

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.006 мМО (mIU)/лунку. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.134 мМО/мл (mIU/ml) для даного набору. Межа виявлення визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (мМО/мл (mIU/ml)) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність (Порівняння методів)

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки від нормальних і вагітних жінок. Загальне число зразків було 106. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	17.4	$y = 0.98(x) - 1.7$	0.978
Референсний	19.5		

Було знайдено тільки незначну розбіжність даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл до ФСГ з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою ФСГ, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
ФСГ	1.0000	---
ЛГ	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
ХГЛ	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
ТТГ	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)



ВИРОБНИК

MONOBIND INC. 100 North Pointe Dr. Lake Forest, CA 92630 - USA Phone: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 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
--	--



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

