

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОЛАКТИНУ, ПОСЛІДОВНА ВЕРСІЯ, МЕТОДОМ ІОА

Prolactin Hormone Sequential (PRLs) Test System

Кат. №: 4425-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 4



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

1.0 ВСТУП

Застосування за призначенням: Кількісне визначення концентрації Пролактину в сироватці крові за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

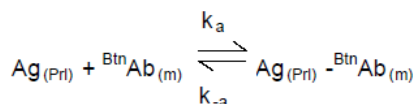
2.0 РЕЗЮМЕ І ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (тип 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, в надлишку, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в лунках стрептавідин і додані біотинильовані моноклональні антитіла до Пролактину.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить нативний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

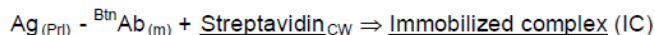
$\text{Ag}_{(\text{Prl})}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{Ag}_{(\text{Prl})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

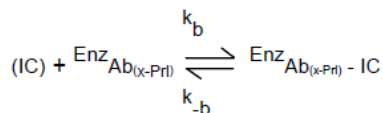
Одночасно в лунках утворюється комплекс при реакції високоафінного стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{CW} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Імобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



$\text{de}^{\text{EnzAb}}_{(\text{x-Prl})}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$\text{EnzAb}_{(\text{x-Prl})} - \text{IC}$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються

- A. Калібратори Пролактину, послідовна версія - 1 мл (мл)/флакон**
6 флаконів референсного матеріалу для антигена Пролактину з концентраціями 0(A), 10(B), 25(C), 50(D), 100(E) і 250(F) нг/мл (ng/ml)*. Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.
Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані відносно 3-го Міжнародного стандарту WHO IS (84/500).
- B. Біотинний Реагент Пролактину, послідовна версія - 13 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- C. Ферментний реагент Пролактину, послідовна версія - 13 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить мічені пероксидазою антитіла в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- D. Планшет, покритий Стрептавідином, 96 лунок**
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)**
Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).
- I. 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 постачаються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) і 0.050 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. 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.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів для венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки 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 (мг)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка натще.

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 0.050 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями низьким, нормальним і високим 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 постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні 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 бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

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

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) сироваткового референсного калібратора, контролю або досліджуваного зразка у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл (µl) Біотинового реагенту Пролактину у кожную лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
- Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- 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) Ферментного Реагенту Пролактину в кожную лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТУ

- Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- 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.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Пролактину в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

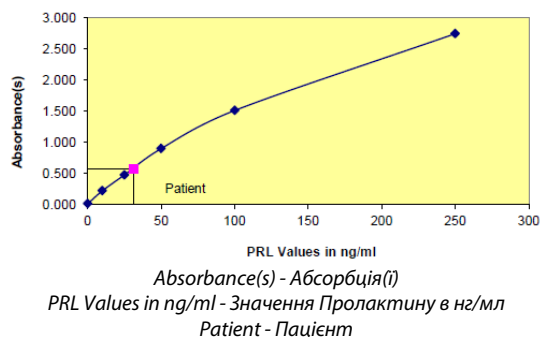
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожную з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Пролактину в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Пролактину в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.576 перетинає стандартну криву при 31.1 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

Примітка: Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для аналізу ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (%U)
Калібратор А	A1	0.012	0.010	0
	B1	0.007		
Калібратор В	C1	0.235	0.219	10
	D1	0.202		
Калібратор С	E1	0.482	0.474	25
	F1	0.465		
Калібратор D	G1	0.883	0.896	50
	H1	0.910		
Калібратор E	A2	1.537	1.508	100
	B2	1.480		
Калібратор F	C2	2.760	2.714	250
	D2	2.669		
Зразок	G2	0.610	0.576	31.1
	H2	0.543		

Малюнок 1



*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора F має бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості 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

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/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою за 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 з використанням AccuBind® ІФА були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тестовими реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто спричиняють ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. (Boscato LM Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin. Chem 1988:3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу слід

використовувати у поєднанні з клінічним обстеженням, історією хворого та усіма 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 розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Зразки пацієнта з аномально високим рівнем пролактину не викликають хук-ефекту, завдяки дизайну аналізу (послідовний метод). Для зразків з значеннями більше 250, розбавте зразок 1/50 нульовим калібратором і повторно проаналізуйте (помножити результат на 50).
8. Пацієнти, які отримують препарати з використанням моноклональних антитіл миші для діагностики або терапії, можуть містити анти-мишачі антитіла людини (НАМА) і можуть показати або помилково підвищені або занижені значення при аналізі.
9. Вагітність, лактація та застосування оральних контрацептивів можуть призвести до збільшення рівня пролактину.
10. Ліки, такі як морфін, резерпін та психотропні препарати, збільшують секрецію пролактину.
11. Оскільки концентрація гормону Пролактину залежить від різних факторів, відмінних від гомеостазу гіпофізу, сама детермінація не є достатньою для оцінки клінічного статусу.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Було проведено дослідження очевидно нормального дорослого населення для визначення очікуваних значень для Тест-системи для визначення Пролактину, послідовна версія AccuBind® ІФА. Очікувані значення (95% довірчі інтервали) представлені в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи Пролактин, послідовна версія AccuBind™ ІФА (в нг/мл (ng/ml))

		Жінки
Дорослі (кількість = 70)		1.2-19.5
Постменопауза (кількість = 10)		1.5-18.5
		Чоловіки
Дорослі (кількість = 70)		1.8-17.0

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірених і 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 внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому знаходиться лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність Тест-системи Пролактин, послідовна версія AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	24	10.6	0.35	3.3
Рівень 2	24	28.6	0.84	3.0
Рівень 3	24	77.5	1.93	2.5

ТАБЛИЦЯ 3

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

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	11.5	0.19	1.7
Рівень 2	10	27.8	0.50	1.8
Рівень 3	10	78.5	2.32	3.0

*Вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Ця процедура має чутливість 0.04 нг (ng). Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.8 нг/мл (ng/ml) для даного набору. Чутливість визначали шляхом визначення мінливості калібратора «0 нг/мл (ng/ml)» та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Достовірність

Тест-систему Пролактин, послідовна версія AccuBind® ІФА порівнювалася з референсним методом. Використовувалися зразки від нормальних і вагітних жінок. Загальне число зразків було 86. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для Пролактин ІФА в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Моноbind	19.0	$y = 1.63 + 1.01(x)$	0.973
Референсний	17.3		

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

14.4 Специфічність

Перехресну реакційну здатність методу визначення гормону пролактину 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 гормону пролактину, необхідною для отримання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
Пролактин гормон	1.0000	---
Лютенізуєчий гормон (ЛГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Фолітропін (ФСГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Хоріонічний гонадотропін (ХГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Тиреотропін (ТТГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Гормон росту (ГР)	< 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 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

