

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ НЕОНАТАЛЬНОГО 17 α -ОН ПРОГЕСТЕРОНУ

5525-300, Neonatal 17 α -OH Progesterone Test System

Каталог. №: 5525-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 10-07-2013

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 ВСТУП

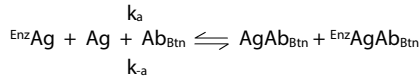
Набір призначений для кількісного визначення концентрації загального 17-ОН Прогестерону людини (неонатального) в людській цільній крові імуноферментним методом, колориметричним.

2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз - тип 7

Даний метод заснований на конкурентному твердофазовому імуноаналізі на висушених краплях крові на фільтрувальному папері WHATMAN тип 903. У цьому методі додаються буфер для елюювання, який містить біотинильовані антитіла, і кон'югат 17-ОНР з пероксидазою хрому, і реагенти змішуються. Відбувається реакція між кон'югатом 17-ОНР-HRP і елююваним 17-ОНР з висушених плям крові за обмежену кількість біотинильованих антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Специфічні Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

AgAb_{Btn} = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = Комплекс кон'югат – антитіла (постійна кількість)

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a / k_{-a}$ = константа рівноваги

Одночасно відбувається реакція між біотином, прикріпленим до антитіл, і стрептавідином, прикріпленим до мікролунок. Незв'язані реактанти (17-ОНР і 17-ОНР-HRP) видаляються по закінченню інкубації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ – іммобілізований комплекс (IC)

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

$\text{Іммобілізований комплекс (IC)} = \text{Ag-Ab}$, пов'язаний з твердою поверхнею

Субстрат реагує з ферментом, пов'язаним в лунках. Ензиматична реакція зупиняється додаванням кислоти. Кінцевий продукт вимірюється при 450 нм. 17-ОНР невідомого зразка визначається за допомогою калібрувальної кривої.



$\text{EnzAgAb}_{\text{IC}}$ = Іммобілізований фермент-мічений реактант

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори N-17ОНР – точки з висушеної крові (2 ряди по 6 точок різних рівнів – 2 х 6)

Шість флаконів референсної сироватки для N-17ОНР (приведені до гематокриту 55%), **приблизні** концентрації 0 (A), 10 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 200 (F) нг/мл, поміщені на фільтри WHATMAN тип 903. Зберігати при 2-8 °С. Додано консерванти.

B. Контролі N-17ОНР – точки з висушеної крові (2 ряди по 3 точки – 2 х 3)

Три рівня контролів N-17ОНР в сухих плямах крові (приведені до гематокриту 55%) з різними концентраціями C1, C2, C3, поміщені на

фільтри WHATMAN тип 903. Зберігати при 2-8 °С. Містять консерванти.

Зауваження 1: значення калібратора і контролю є лот специфічними і були розроблені з врахуванням встановленого специфічного діапазону. Точні концентрації вказані на зовнішній стороні алюмінієвого пакета.

Зауваження 2: Стандарти специфічні для кожного лота, приготовані на основі цільної людської крові, прокалібровані по N-17ОНР точках від CDC.

Зауваження 3: Не використовуйте споти з кров'ю з ознаками спікання, згортання або забруднення.

C. Біотиновий реагент N-17ОНР – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить поліклональні біотинильовані IgG антитіла до N-17ОНР в буфері, зелений барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °С.

D. Ферментний реагент N-17ОНР – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить кон'югат N-17ОНР з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині з червоним барвником. Доданий консервант. Зберігати при 2-8 °С.

E. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

F. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАВ в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °С.

G. Розчин субстрату – 14 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить 8 мл сильної кислоти (0.5 M H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °С.

I. Інструкція.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: не піддавати впливу прямого сонячного світла та нагріванню. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. стабільність набору і компонентів вказані на етикетках.

Зауваження 3: Перераховані реагенти призначені для одного 96-луноквого мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Лабораторний шейк ер з частотою обертання 150 об/хв..
2. Диспенсери на 50 мкл, 100 мкл та 350 мкл з точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери перемінного об'єму 20-200 мкл та 200-1000 мкл для розведення кон'югату
4. Перфоратор з розміром отвору 1/8 дюйма.
5. Пінцет для підбору спотів.
6. Мікропланшетном вошер або бутиль, що стискається (опційно)
7. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
8. Фільтрувальний папір для висушування лунок
9. Пластикові плівка або кришка для інкубації мікропланшетів.
10. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивок
11. Таймер
12. Контрольні матеріали

5.0 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, HCV 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, NNS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Для скринінгу збирають зразки крові новонароджених з п'яти. Необхідно зібрати обсяг, достатній для заповнення маркованого кружка на фільтрувальному папері марки WHATMAN тип 903. Для збору зразків для дослідження на САН зберіть проби на 3-5 день від народження. Використовуйте разові ланцети з наконечником менш ніж 2.5 мм для проколу медіальної або латеральної поверхні п'яти. Дозвольте виступити краплі крові, достатній для заповнення 5/8 дюйма в діаметрі на фільтрувальному папері. Легенько доторкніться краплі фільтрувальним

папером. НЕ ПРИТИСКАТИ ДО ШКІРИ. НЕ ТОРКАТИСЬ ЗОНИ ПЛЯМИ. Отриманий зразок помістіть горизонтально і висушіть при кімнатній температурі, як мінімум 3 години. Уникайте доторкання плямою до інших поверхонь і охороняйте від прямого світла. Надішліть зразки в лабораторію на протязі 24 годин після їх забору у відповідному контейнері. При отриманні в лабораторії зберігайте зразки при 2-8 °С, уникаючи прямого світла і вологи.

Отримані зразки сухої крові можна зберігати при 2-8 °С протягом 3 тижнів, уникаючи прямого світла і вологи.

Не приймаються зразки:

1. Зразки зібрані не на папір WHATMAN тип 903.
2. Плями крові не повністю просочилися з двох боків.
3. Плями крові з ознаками спікання або згортання.
4. Плями крові з ознаками вологи.

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 буфер

Розведіть вміст концентрату промивного буферу до 1000 мл дистильованою чи деіонізованою водою в придатній посудині. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °С до 60 днів.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він виглядає голубим.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти та контролю повинні досягнути кімнатної температури (20-27°С).

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °С.**
2. Для кожного стандарту, контролю та зразка перфоратором виріжте диски діаметром 1/8 дюйма для точок крові на фільтрувальному папері з нанесеними стандартами, контролями і зразками пацієнтів і перенесіть у відповідні лунки планшета. **(Не виріжайте точки на папері за межами маркованої межі та біля краю кров'яної точки).**
3. Додайте по 100 мкл Реагенту N-17ОНР Biotin в кожен лунку.
4. Додайте по 50 мкл Ферментного Реагенту N-17ОНР в кожен лунку.
5. Аккуратно потрусіть планшет (20-30 секунд). **(Переконайтеся, що всі кров'яні точки повністю занурені в рідину і не прилипають до стінок лунок.)**
6. Закрийте планшет пластиковою кришкою. Інкубуйте 120 хвилин при температурі навколишнього середовища з струшуванням на шейкері зі швидкістю 150 об/хв.
7. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация. **ЗАУВАЖЕННЯ: Впевніться, що всі кров'яні точки видалені з лунок.**
8. Додайте 350 мкл Промивного Буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще 4 рази (загальна кількість циклів промивки - 5). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 4 рази.**
9. Додайте по 100 мкл Субстрату в кожен лунку.
10. Накрийте мікропланшет і інкубуйте 15 хвилин при температурі навколишнього середовища.
11. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і обережно перемішайте до утворення кольору. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
12. Виміряйте величини поглинання в кожній лунці на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.**

Зауваження: Калібратори і контролю, що поставляються з набором, повинні досліджуватися в дублях. Кожен планшет розрахований на 38 зразків пацієнтів при використанні всіх калібраторів і контролів. Якщо потрібно тестувати більше 38 зразків одночасно, можливо використовувати 1 набір калібраторів і контролів для синглів на 1 планшет, і при розрахунках враховувати середнє значення калібраторів/контролів з планшета. Дослідіть таким чином не більше 3 планшетів, таким чином, виїде 129 зразків.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації N-17ОНР 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 міліметровому папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації N-17ОНР в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
4. Визначте невідомі концентрації N-17ОНР у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.755 перетинає стандартну криву при 47.69 нг/мл (див. мал.1)

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор А	A1	3.071	3.011	0.0
	B1	2.933		
Калібратор В	C1	2.321	2.217	10.0
	D1	2.072		
Калібратор С	E1	1.585	1.607	25.0
	F1	1.624		
Калібратор D	G1	1.123	1.067	50.0
	H1	0.993		
Калібратор E	A2	0.756	0.679	100.0
	B2	0.616		
Калібратор F	C2	0.396	0.410	200.0
	D2	0.423		
Контроль 1	E2	2.001	1.925	15.584
	F2	1.848		
Контроль 2	G2	0.760	0.755	81.720
	H2	0.750		
Пацієнт	A3	1.104	1.123	47.69
	B3	1.141		

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

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1 Якість набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
4. 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.
5. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
6. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
7. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
8. 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.
9. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
10. 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.
11. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
4. 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.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Даний набір розроблений тільки для скринінгу новонароджених. Він не повинен використовуватися для підтверджуючих тестів, моніторингу терапії або пренатального тестування.
7. Даний скринінговий метод визначає тільки випадки САН, обумовлені дефіцитом 21-гідроксилази, що складає близько 90% випадків. Їм не визначаються випадки САН, обумовлені дефіцитом інших ферментів, наприклад, 11-бета-гідроксилази.
8. Недоношені і новонароджені з низькою вагою мають тенденцію до підвищених рівнів 17ОНР.
9. Проби, забрані до 2 дня життя, мають підвищені рівні через плацентарний перенос.
10. Це скринінговий тест, дані з підвищеними рівнями 17ОНР, отримані з плям крові, повинні підтверджуватися методикою екстрагованого 17ОНР із зразками сироватки.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

ДІАПАЗОН ЗНАЧЕНЬ: Аналітичний діапазон = 5 - 200 нг/мл

Зразки, які потрапляють в діапазон калібрувальної кривої, вважаються такими. Зразки, які випадають з діапазону, подаються як "менше 5 нг/мл" або "більше 150 нг/мл", відповідно. Межа визначення набору становить 0.56 нг/мл.

Наступне базується на посібниках з програм скринінгу з літератури. Для досліджень, які відповідають критеріям якості лабораторії, результати отримані менше 22 нг/мл. Необхідно провести дослідження наступного зразка для діапазону 22-35 нг/мл. Значення, вищі за 35 нг/мл, мають бути підтверджені дослідженням зразків сироватки на іншому наборі.

Оскільки недоношені мають концентрації 17ОНР набагато вище ніж народжені в строк, cut-off рівень становить 80 пг/диск або в еквіваленті сироватки 57 нг/мл (з розрахунку, що 3 мм диск містить близько 1.4 мкл сироватки).

Даним набором досліджувалися 148 зразків (спотів) від нормальних новонароджених, які не отримували стероїдної терапії. Розраховане середнє значення склало 12.2 нг/мл, при 69% зразків в діапазоні 5-15 нг/мл.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору N-17ОНР всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контролів сухої крові трьох різних рівнів. Число, значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 1 і 2.

ТАБЛИЦЯ 1
Точність в аналізі (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	14	22.7	1.84	7.1
Нормальний	14	55.8	5.40	9.7
Високий	14	114.8	7.08	6.2

ТАБЛИЦЯ 2
Точність між аналізами (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	18	22.5	2.11	9.4
Нормальний	18	57.6	6.01	10.5
Високий	18	118.1	15.00	12.7

*вимірювання проводились в дублікатах на протязі 6 місяців.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.56 нг/мл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Використовувалися зразки спотів з висушеної кров'ю з концентраціями 5-80 нг/мл. Загальне число зразків було 150. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для Нео-17-ОН ПРОГЕСТЕРОН ІФА в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 3

Метод	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	$y = 0.920 + 0.890(x)$	0.970
Референсний		

Було знайдено лише незначне розходження даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують чудову узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Антисироватка, використовувана в наборі, є високоспецифічною для визначення 17-альфа-гідроксипрогестерона. Наступними натуральними стероїдами в різних концентраціях насичувалася пулована цільна кров, приведена до гематокриту 55%, і наносилася на фільтрувальний папір S&S типу 903, висушувалася і досліджувалася. Відсоток вказує перехресну реактивність на перетині 50%.

Речовина	Концентрація нг/мл	Перехресна реактивність
11-Дезоксикортизол	78-20 000	5.2
Прогестерон	78-20 000	4.6
17-Альфа-Гідроксипрегненолон	78-20 000	3.7
17-Альфа-Гідроксипрегненолон Сульфат	600-10 000	1.4
Прегненолон Сульфат	78-20 000	менше 0.1
Дезоксикортикостерон	20 000	менше 0.1
Альдостерон	20 000	менше 0.1
Холестерол	20 000	менше 0.1
Кортикостерон	20 000	менше 0.1
Кортизол	20 000	менше 0.1
Дегідроепіандростерон	20 000	менше 0.1
Дигідротестостерон	20 000	менше 0.1
17альфа Естрадіол	20 000	менше 0.1
17 бета Естрадіол	20 000	менше 0.1
Естріол	20 000	менше 0.1
Естрон		
Тестостерон		

14.5 Лінійність

Стандартами 17ОНР насичувалися 3 зразка цільної крові, які потім серійно розлучалися в цільної крові і наносилися плямами на фільтрувальну папір Ватман тип 903, висушують і досліджувалися. Отримані дані - див. Табл. в оригіналі інструкції.

14.6 Відновлення

Стандартами 17ОНР насичувалися 2 зразка цільної крові, в 3 концентраціях. Насичені зразки наносилися плямами на фільтрувальну папір Ватман тип 903, висушують і досліджувалися. Отримані дані - див. Табл. в оригіналі інструкції.



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

