

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛОБУЛІНУ, ЩО ЗВ'ЯЗУЄ СТАТЕВІ ГОРМОНИ МЕТОДОМ ІФА

Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) Test System

Кат. №: 9125-300A

Дата випуску інструкції: 20-12-2023

Версія: 3



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

1.0 ПРЕДСТАВЛЕННЯ

Призначення: Кількісне визначення концентрації Глобуліну, що зв'язує статеві гормони (ГЗСГ), у сироватці крові людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

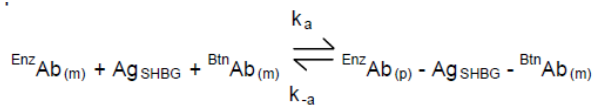
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла з високою спорідненістю та специфічністю (кон'юговані та іммобілізовані ферменти) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні мікропланшету через взаємодію стрептавідину, нанесеного в лунки, та екзогенно доданого біотинильованого, моноклонального анти-ГЗСГ антитіла.

При змішуванні моноклонального біотинильованого антитіла, міченого ферментом антитіла та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном та антитілами, без конкуренції та стеричних перешкод, з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

Ag_{SHBG} = Нативний антиген (змінна кількість)

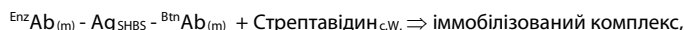
$\text{Enz} \text{Ab}_{(m)}$ = Ферментно-мічене полоклональне антитіло (надлишкова кількість)

$\text{Enz} \text{Ab}_{(m)} - \text{Ag}_{\text{SHBG}} - \text{B}^{\text{tn}} \text{Ab}_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно комплекс осідає в лунці через реакцію високої спорідненості стрептавідину та біотинильованих антитіл. Ця взаємодія проілюстрована нижче:



Стрептавідин_{c.w.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

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

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відокремлюється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, прямо пропорційна концентрації нативного антигену. За допомогою декількох різних референсних сироваток з відомими значеннями антигену може бути сформована крива реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію антигену невідомо.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори ГЗСГ - 1 мл (мл)/флакон

Шість (6) флаконів референсних калібраторів на основі сироватки людини з концентраціями 0 (A), 10 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 250 (F) нмоль/л (nmol/l). Було додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C). (Калібратори стандартизовані згідно з другим стандартом BOO3 IS 08/266 для ГЗСГ).

B. Ферментний Реагент ГЗСГ - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) або два (2) флакони, що містять анти-людський ГЗСГ-HRP і біотинильований анти-людський ГЗСГ в білково-стабілізуючій матриці. Було додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Розчинник ГЗСГ - 60 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон білково-стабілізуючої матриці. Було додано консервант. Зберігати при температурі 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 Промивного розчину - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в буферному фізіологічному розчині. Було додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) в ацетатному буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в ацетатному буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів ідентифікована на етикетці.

Зауваження 3: Наведені вище реагенти призначені для одного 96-лунового мікропланшету.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) та 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 0.300 мл (мл) (300 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 мікропланшетів для кроків інкубації.
7. Вакуумний аспіратор для кроків промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Матеріали контролю якості.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Встановлено, що всі продукти, які містять людську сироватку, не реагують на поверхневий антиген гепатиту В, антитіла до ВІЛ 1 і 2 і гепатиту С з реагентами, ліцензованими FDA. Оскільки жоден відомий тест не може забезпечити повну впевненість у відсутності інфекційних агентів, усі продукти на основі людської сироватки слід розглядати як потенційно небезпечні та здатні передавати захворювання. Належні лабораторні процедури поводження з продуктами крові можна знайти в Центрі контролю захворювань/Національному інституті здоров'я, «Біологічна безпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях», 2-е видання, 1988 р., публікація HHS № (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору має здійснюватися відповідно до місцевих нормативних та законодавчих вимог.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками має бути сироватка крові; дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. Для точного порівняння з встановленими нормальними значеннями повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися для зразків. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (мг)/добу), не слід брати зразки протягом принаймні 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка натщесерце.

Зразки можуть зберігатися в холодильнику при 2-8 °C (°C) максимум 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 використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролю на рівнях у низькому, нормальному та підвищеному діапазонах для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі, а значення визначати в кожній проведеній процедурі тестування. Для відстеження ефективності наданих реагентів слід підтримувати карти контролю якості. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про непомічену зміну умов аналізу або погіршення якості реагентів набору. Щоб визначити причину відхилень, слід використовувати свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Промивний буфер**
Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (мл) з дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте розведений буфер при температурі 2-30 °C (°C) до 60 днів.
- Розчин Робочого субстрату** - Стабільний протягом одного (1) року
Перелийте вміст бурштинового флакона, позначеного як Розчин «А», у прозорий флакон, позначений як Розчин «В». Помістіть жовту кришку на прозорий флакон для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Розведення зразка пацієнта (1/21)**
Внесіть по 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) кожного зразка пацієнта в 0.500 мл (мл) (500 мкл (μl)) розчинника сироватки. Накрийте і ретельно перемишайте перевертанням. Зберігайте при температурі 2-8 °C (°C) до сорока восьми (48) годин.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він набув блакитного забарвлення.

Зауваження 2: Не використовуйте забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом****

- Відформатуйте лунки мікропланшета для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу в дублях. Поверніть невикористані мікролункові стрипи в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Піпетуйте по 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта* у відповідні лунки.
**Потребується розведення зразка пацієнта - дивіться розділ 8.0 Підготовка реагентів.*
- Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) Ферментного реагенту ГЗСГ в кожну лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти близько до дна лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте.
- Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів»), декантуйте або аспіруйте. Повторіть процедуру ще два додаткових рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника. Якщо використовується пляшка-дозатор, необхідно заповнити кожну лунку, витискаючи контейнер (уникати утворення повітряних бульбашок), щоб розподілити розчин. Декантувати розчин для промивання і повторити ще два (2) рази.
- Додайте по 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) розчину Робочого субстрату в кожну лунку (див. розділ «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності, щоб мінімізувати час реакції.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Додайте 0,050 мл (мл) (50 мкл (μl)) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемишайте протягом 15-20 секунд.
- Зчитайте абсорбцію в кожній лунці при довжині хвилі 450 нм (nm) (використовуючи референсну довжину хвилі 620-630 нм (nm)), щоб мінімізувати недоліки лунки у пристрої для зчитування мікропланшетів. Результати слід зчитувати протягом тридцяти (30) хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації ГЗСГ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

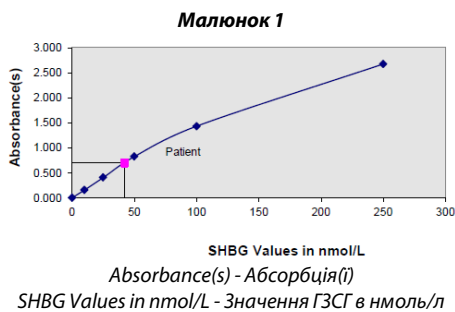
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть на лінійному міліметровому папері значення поглинання для кожного дубліката референсної сироватки проти відповідної концентрації ГЗСГ у нмоль/л (nmol/l) (не усереднюйте дублікати референсної сироватки перед побудовою графіка).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву через відкладені точки.
- Щоб визначити концентрацію ГЗСГ для невідомого, знайдіть середнє значення поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і прочитайте концентрацію (в нмоль/л (nmol/l)) по горизонтальній осі графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання (0.698) перетинає криву доза-відповідь при концентрації ГЗСГ 42.06 нмоль/л (nmol/l) (див. рис. 1).

Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для обробки даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо використовується таке програмне забезпечення, слід провести перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція	Середня абсорбція (B)	Концентрація нмоль/л (nmol/l)
Калібратор А	A1	0.005	0.006	0
	B1	0.007		
Калібратор В	C1	0.161	0.160	10
	D1	0.159		
Калібратор С	E1	0.404	0.407	25
	F1	0.409		
Калібратор D	G1	0.826	0.826	50
	H1	0.826		
Калібратор E	A2	1.425	1.433	100
	B2	1.441		
Калібратор F	C2	2.689	2.674	250
	D2	2.658		
Пацієнт 1	A3	0.717	0.698	42.06
	B3	0.679		

*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 А повинна бути ≤ 0.05 .
2. Оптична щільність Калібратора F повинна бути ≥ 1.3 .
3. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS і форма аналізу ризиків для цього продукту доступні за запитом від компанії 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 тривати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу.
3. Не використовувати високоліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання розчину субстрату 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Нездатність належним чином видалити залишки розчину на етапах промивання аспірацією або декантацією може призвести до поганій реплікації та помилкових результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лоту. 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 інструкцій можуть давати невірні результати.
10. Необхідно суворо дотримуватися всіх застосованих національних стандартів, правил і законів, включаючи, але не обмежуючись, належними лабораторними процедурами, щоб забезпечити відповідність і належне використання пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, зчитувачів, вошерів 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 IVD 98/79/ЄС маркованих CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, може бути отриманий за запитом на електронну пошту Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
2. Самі лише лабораторні результати є лише одним з аспектів визначення догляду за пацієнтом і не повинні бути єдиною основою для терапії, особливо якщо результати суперечать іншим визначенням.
3. Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ІФА були розроблені для максимального усунення інтерференцій; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають 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

повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.

4. Для отримання дійсних результатів адекватній контролі та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм та відповідати вимогам аналізу.
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'ютерна програма, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Концентрації сироваткового ГЗСГ залежать від безлічі факторів: в тому числі, якщо пацієнт сенсифікований, скільки разів пацієнт піддався впливу специфічного алергену і т. д. Тільки концентрація загального ГЗСГ не є достатньою для оцінки клінічного статусу. Всі клінічні результати, особливо специфічне тестування на алергії, слід брати до уваги при визначенні клінічного стану пацієнта.
8. Оскільки всі атопічні реакції не є опосередковано пов'язаними з ГЗСГ, необхідно взяти до уваги всю відповідну клінічну інформацію, перш ніж приймати будь-яке визначення щодо пацієнтів, які можуть бути в межах норми.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для «нормального» населення очікувані діапазони для Тест-системи ГЗСГ AccuBind® ІФА деталізовані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи ГЗСГ AccuBind® ІФА	
ПОПУЛЯЦІЯ	ДІАПАЗОН
Чоловіки	10-57 нмоль/л (nmol/l)
Жінки (Не вагітні)	18-144 нмоль/л (nmol/l)

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, тестованої популяції 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

Щоб підтвердити точність в аналізі Тест-системи ГЗСГ AccuBind® ІФА, двадцять реплік кожної з трьох пулованих сироваток (низький, середній і високий діапазони кривої дози-відповіді) були проаналізовані в одному аналізі. Була отримана точність в аналізі від 1.5 до 2.6%.

ТАБЛИЦЯ 2

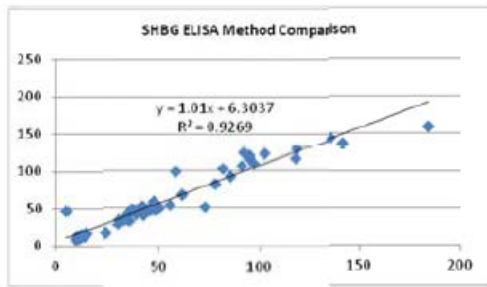
Точність в аналізі (нмоль/л (nmol/l))				
Зразок	N	x	σ	C.V., %
Контроль, Рівень 1	24	18.331	0.764	4.2
Контроль, Рівень 2	24	49.516	2.128	4.3
Контроль, Рівень 3	24	83.955	4.799	5.7

14.2 Чутливість

Тест-система ГЗСГ AccuBind® ІФА має чутливість 0.0122 нмоль/л (nmol/l). Чутливість була встановлена шляхом визначення варіабельності сироваткового калібратора 0 нмоль/л (nmol/l) та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Достовірність

Тест-систему ГЗСГ AccuBind® ІФА порівнювали з референсним методом. Біологічні зразки з рівнями ГЗСГ в низькому, середньому і високому діапазонах були використані; значення коливалися від 4.6 до 184.0 нмоль/л (nmol/l). Загальна кількість таких зразків становила 60. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для цього методу ГЗСГ AccuBind® ІФА у порівнянні з референсним методом (Табл. 3).



SHBG ELISA Method Comparison - Порівняння методів ІФА ГЗСГ

ТАБЛИЦЯ 3

Параметр	Monobind	Референсний
Низький	8.86	4.6
Високий	160.39	184.02
Середнє	56.09	49.79
Перехоплення		1.01
Нахил		6.3037
Кореляція (R ²)		0.9269

Лише незначні значення зміщення між цим методом та референсним методом вказують на близькість середніх значень. Рівняння найменшої квадратичної регресії та коефіцієнт кореляції свідчить про чудову узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Специфічність Тест-системи ГЗСГ AccuBind® ІФА до тісно пов'язаних імуноглобулінів оцінювалася шляхом їх додавання у подвоєній фізіологічній концентрації в матрицю сироватки.

ТАБЛИЦЯ 4

Специфічність та перехресна реактивність ГЗСГ ІФА

Субстанція	Перехресна реактивність
Глобулін, що зв'язує кортикостероїди	< 0.3
Тироксин, що зв'язує глобулін	< 0.08



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

