

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИНА В

A81303, Inhibin B Gen II ELISA

Каталог. № : **A81303**

Методика от **05-2014**

Количество : **96**

Производитель: **Beckman Coulter, Inc., (США)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Inhibin B Enzyme-Linked Immunosorbent (ELISA) содержит материалы для количественного измерения димерного ингибина В в человеческой сыворотке и литий-гепариновой плазме. Только для использования в *in-Vitro* диагностике.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный анализ является ферментативно усиленным трехшаговым анализом типа "сэндвич". В анализе калибраторы, контроли и образцы инкубируют в микротитровальных лунках, которые были покрыты антителом анти-ингибина В. После инкубации и промывки лунки инкубировали с биотинилированным антителом выявления α -субъединицы анти-ингибина. После второй инкубации и стадии промывки лунки инкубируют со стрептавидином, меченым ферментом пероксидазы хрена (HRP). После третьей инкубации и стадии промывки лунки инкубировали с субстратом тетраметилбензидина (ТМВ). После инкубации добавляют кислый стоп раствор. Степень ферментативного окрашивания субстрата определяется измерением двойной длины волны поглощения при 450 нм в качестве основного фильтра и 630 нм в качестве основного референсного фильтра. Измеренное поглощение прямо пропорционально концентрации ингибина В в образцах. Набор используется для построения калибровочной кривой поглощения в зависимости от концентрации ингибина. Концентрации ингибина В в образцах затем могут быть вычислены из этой калибровочной кривой.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Микрострипы, покрытые антителами Ингибина В Gen II:

- Один держатель, содержащий 96 полистироловых микротитрационных лунок, покрытых мышинными моноклональными антителами к В-активину, иммобилизованных на внутренней стенке каждой лунки.
- Хранить при 2-8 °С до указанного срока годности в закрывающемся пакете, защищенном от влаги.

Концентрат Конъюгата Биотин-антитела Ингибина В Gen II:

- Один флакон 0.4 мл, содержит раствор биотинилированного антитела α -субъединицы анти-ингибина в буфере с протеином (мышь), < 0.5 % ProClin 300.
- Хранить при 2-8 °С до окончания срока годности.
- Развести за 10-30 минут перед использованием в Разбавителе биотинового Конъюгата Ингибина В Gen II.

Стрептавидин-ферментный конъюгат:

- Одна бутылка, 13 мл, содержит конъюгированный HRP в буфере с протеином (рыба) и < 10% метанола.
- Хранить при 2-8 °С до истечения срока годности.
- Поставляются готовые к использованию.

Рабочий буфер Ингибина В Gen II:

- Один флакон, 8 мл, содержащий буфер с бычьим сывороточным альбумином (BSA), белок (бычий, мыши, козы), поверхностно-активное вещество и < 0,5% ProClin 300.
- Хранить при 2-8 °С до истечения срока годности.

Разбавитель Биотинового конъюгата Ингибина В Gen II:

- Одна бутылка, 13 мл, содержит буфер с BSA, белок (крупного рогатого скота, мыши, козы), поверхностно-активное вещество и < 0.5% ProClin 300.
- Хранить при 2-8 °С до истечения срока годности.

ТМБ хромогенный раствор:

- Один флакон, 11 мл, содержит ТМБ в цитратном буфере с перекисью водорода.
- Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

Концентрат Промывочного Буфера В:

- Один флакон, 60 мл раствора буфера с неионным детергентом.
- Хранить при 2-8 °С или при комнатной температуре (~25 °С) до указанного срока годности.
- Перед использованием разбавлять 10-кратно деионизированной водой.

Сток раствор А:

- Один флакон, 11 мл, содержащий 0.2 М серной кислоты.
- Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Ингибин В Gen II Калибраторы и Контроли A81304
2. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450/405 нм с фильтрами сравнения 600-630 нм
3. Деионизированная вода
4. Пипетка, позволяющая пипетировать объемы 10 - 1000 мкл
5. Микропланшетный шейкер с возможностью установить скорость 600-800 об/мин
6. Автоматический микропланшетный вошер
7. Вортекс
8. Фильтровальная бумага для высушивания стрипов
9. Логарифмическая бумага для ручного обсчета данных

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для диагностики *in-vitro*.

- Соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики.
- При соблюдении правил описанной процедуры риск работы с образцами и материалами, содержащими компоненты крови, минимален. Однако, со всеми материалами, содержащими компоненты крови, необходимо обращаться, как с потенциально опасными, соблюдая стандартные меры предосторожности и правила надлежащей лабораторной практики, вне зависимости от их происхождения, обработки и предшествующей сертификации (10). Используйте соответствующие дезинфектанты для обеззараживания. Храните и утилизируйте такие материалы и контейнеры для их хранения в соответствии с локальными правилами и рекомендациями.
- Xi: Раздражающее вещество: < 0.5 % ProClin 300.
R 43: Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей.
S 37: Использовать перчатки.
S 28: После контакта с кожей немедленно вымыть с мылом и большим количеством воды.
- Xn: вредный: < 10 % метанола.
R 20/21/22: Вреден при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании.
R 68: Вреден: Возможен риск необратимых эффектов при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании.
S 36/37: Использовать подходящую защитную одежду и перчатки.
S 45: В случае инцидента или при плохом самочувствии, обратиться за медицинской помощью.
- Лист данных по безопасности материалов (MSDS) доступен по запросу.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ИХ ПОДГОТОВКА

- Рекомендуется использование сыворотки и литий гепаринизированной плазмы.
- Соблюдайте следующие рекомендации при обращении, тестировании и хранении образцов:
 - a) При заборе крови должны соблюдаться обычные меры предосторожности.
 - b) Позволить образцам сыворотки полностью стечь перед центрифугированием.
 - c) Хранить пробирки всегда закупоренными.
 - d) В течение 2 часов после центрифугирования поместить минимум 500 мкл образца, свободного от клеток, в пробирку для хранения. Немедленно закупорить пробирку.
 - e) Сыворотка и литий гепаринизированная плазма хранятся при 2-8 °С в течение 48 часов.
 - f) Если анализ не будет проведен в течение 48 часов или для транспортировки образцов, образцы должны быть заморожены при -20 °С.
- При подготовке образцов придерживаться следующих правил:
 - a) Убедиться, что остаточный фибрин и клеточный материал удалены перед тестированием.
 - b) Следовать рекомендациям производителя по центрифугированию.

- Каждая лаборатория должна установить соответствие пробирок для забора образцов и продуктов для отделения сыворотки. Вариация этих продуктов может существовать между производителями и от партии к партии.
- Избегайте повторных циклов заморозки и оттаивания образцов.
- Не используйте для анализа сильно гемолизированные или липемичные образцы.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПОРЯДКУ РАБОТЫ

- Для успешного использования набора Ингибин В Gen II ELISA необходимо полное понимание вложенной инструкции.
- Правильные результаты будут получены только при использовании точной лабораторной техники и аккуратном выполнении инструкции.
- Стандартная кривая должна быть включена в каждое определение.
- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре (~25°C).
- Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, осторожно переворачивая.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов.
- Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации с субстратом, добавляйте стоп раствор в ячейки в той же последовательности и с такой же скоростью, как и раствор ТМБ.
- Избегайте загрязнения микроорганизмами реагентов, особенно концентрата конъюгата и разбавителя конъюгата.
- Избегайте загрязнения хромогенного раствора ТМБ ферментным конъюгатом.
- Используйте чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта, контроля и образца.
- Для добавления хромогенного раствора ТМБ и стоп-раствора не используйте пипетки с металлическими частями.
- Контейнеры и наконечники полуавтоматических пипеток, используемые для раствора ферментного конъюгата и хромогенного раствора ТМБ, при повторном использовании следует тщательно промывать дистиллированной водой до и после каждого использования. Фермент, используемый как метка, инертен к кислороду и крайне чувствителен к микробиологическим загрязнениям, хлорноватистой кислоте, азиду натрия и ароматическим хлорогидрокарбонатам, зачастую находящимся в воде.
- Используйте воду высокого качества.
- Избегайте контакта реагентов с источниками тепла и прямым солнечным светом при хранении реагентов и во время инкубации.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовление реагентов:

1. Промывочный буфер

Разбавить 1 часть Промывочного концентрата с 24 частями деионизированной воды. Промывочный буфер стабилен один месяц при хранении при комнатной температуре в плотно закрытом сосуде.

2. Биотиновый конъюгат Антител Ингибина В Gen II

Концентрат должен быть разбавлен в соотношении 1 часть в 50 частях Разбавителя Биотинового Конъюгата Ингибина В Gen II согласно числу используемых лунок. Для всей пластины пипетировать точно 220 мкл концентрата в 11 мл Разбавителя Биотинового Конъюгата Ингибина В Gen II.

ПРИМЕЧАНИЕ: Концентрат антитело-биотиновый конъюгат должен быть разбавлен за 10-30 минут перед использованием.

3. Микроячейки

Выберите необходимое для анализа количество привитых ячеек. Верните лишние ячейки в закрывающийся пакет с осушителем. Пакет должен быть защищенным от влаги.

Проведение анализа

Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре (~25° С) и тщательно перемешаны перед использованием осторожным переворачиванием. Стандарты, контроли и образцы пациентов должны анализироваться в дублях.

1. Пометьте стрипы, которые будут использованы.
2. Внесите по 50 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте по 50 мкл раствора Рабочего буфера Ингибина В в каждую ячейку, используя точную пипетку.
4. Инкубируйте в течение 2 часов при ~25°C на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин.

5. В течение последних 10-30 минут инкубации подготовить Раствор Конъюгата биотин-антитело Ингибина В Gen II путем разбавления Концентрата Конъюгата в Разбавителе Конъюгата, как описано в разделе "Подготовка реагентов" этого листка-вкладыша.
6. Аспирировать и промыть каждую лунку пять раз Промывочным Раствором с помощью автоматического вошера для микропланшетов или вручную с помощью прецизионной пипетки. Постучать планшетом по впитывающей бумаге для высушивания.

ПРИМЕЧАНИЕ: Настоятельно рекомендуется использование автоматического микропланшетного промывочного устройства – вошера. Неполная промывка негативно влияет на правильность результатов. Если микропланшетный вошер недоступен:

- a) полностью удалите жидкость из каждой ячейки
- b) внесите 350 мкл Промывочного буфера в каждую ячейку, используя точную пипетку
- c) аспирируйте жидкость снова
- d) повторите шаги (b) и (c) четыре раза.

7. Добавьте по 100 мкл раствора Биотинового конъюгата в каждую ячейку, используя точную пипетку.
 8. Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин в течение 1 часа при ~25°C.
 9. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером как указано в шаге 5 настоящего протокола. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.
 10. Добавьте по 100 мкл раствора стрептавидин-ферментного конъюгата в каждую ячейку, используя точную пипетку.
 11. Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин в течение 30 минут при ~25 °C.
 12. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.
 13. Добавьте 100 мкл хромогенного раствора ТМБ в каждую лунку, используя точную пипетку.
- Не подвергать прямым солнечным лучам.**
14. Инкубируйте при комнатной температуре ~25 °C в течение 8-12 минут на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин.
Замечание: вы должны знать, что окраска может развиваться быстрее или медленнее рекомендованного времени инкубации, это зависит от конкретной комнатной температуры. Пожалуйста, контролируйте визуально развитие окраски для оптимизации времени инкубации.
 15. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, используя точную пипетку.
 16. Измерьте оптическую плотность ячеек при 450 нм. Измерение оптической плотности микроплшета должно быть выполнено в течение 30 минут после добавления стоп-реагента раствора.

Замечание:

- i. Необходимо при считывании абсорбции запрограммировать нулевой стандарт как «Бланк».
- ii. Если возможно измерение на двух длинах волн, используйте длину волны сравнения 600 или 630 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Вычитите среднее поглощение калибратора А (бланк) от среднего поглощения. Используя логарифмическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений среднего поглощения калибраторов В-Г, контролей и образцов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации Ингибина В в пг/мл на горизонтальную ось X, используйте линейную аппроксимацию. Альтернативно, для построения калибровочной кривой можно использовать линейные оси, а для расчета рекомендуется аппроксимация гладкий сплайн. Проведите оптимальную кривую, используя среднее двух измерений.
3. Определите концентрацию Ингибина В в контролях и образцах из стандартной кривой, сравнивая рассчитанные средние значения поглощения с соответствующей концентрацией Ингибина В.
4. Все образцы со значениями, большими, чем у самого высокого стандарта, предварительно развести стандартом А 0 пг/мл и проанализировать повторно.
5. Любые образцы со значениями ниже, чем у самого низкого стандарта, следует считать такими же.
6. Умножить полученное значение на коэффициент разведения, если это необходимо.
Примечание: Если полученная оптическая плотность превышает возможности ридера, необходимо второе считывание на 405 нм (фильтры сравнения 600 или 630). В

этом случае постройте вторую стандартную кривую как описано выше по полученным значениям для всех стандартов при 405 нм. Концентрацию образцов, не вписывающихся в предыдущий масштаб, определите по новой стандартной кривой. Не меняйте значения в пределах возможностей ридера, полученные при 450 нм, значениями, полученными при 405 нм.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Реагенты, применяемые в этом наборе, оптимизированы для измерения уровня Ингибина В в сыворотке и литий гепаринизированной плазме.
- В анализах с использованием антител существует возможность интерференции гетерофильных антител в образце. Образцы от лиц, которые регулярно находились в контакте с животными, или прошли курс иммунотерапии или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулина, могут продуцировать антитела, например, НАМА, что интерферирует с иммуноанализом. Кроме того, другие гетерофильные антитела, такие как человеческие антикозильные антитела могут присутствовать в образце
- Если есть признаки микробного загрязнения или чрезмерной мутности реагента, выбросить флакон.
- Результаты данного анализа должны интерпретироваться в совокупности с общей историей болезни пациента, включая: симптомы, клиническую историю, данные дополнительных тестов и другая информация.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Каждая лаборатория должна установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения надлежащего исполнения.
- Контроли Ингибина В Gen II ELISA или другие коммерческие контроли должны укладываться в установленные доверительные интервалы.
- Доверительные интервалы для контролей Ингибина В Gen II ELISA напечатаны на этикетке флакона.
- Полная калибровочная кривая, а также низкий и высокий уровни контролей должны быть включены в каждый анализ.
- Раствор ТМБ должен быть бесцветным или светло-желтым. Развитие голубой окраски может свидетельствовать о загрязненном или нестабильном реагенте.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

1. Каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.
2. Образцы сыворотки были как закуплены, так и использовались аликвоты, хранящиеся в морозильных камерах от предыдущих исследований. Эти образцы были проанализированы с помощью набора Ингибин В Gen II. Ожидаемый диапазон для Ингибина В рассчитывался с помощью 85-95% непараметрической оценки с использованием Analyse-it для Microsoft Excel.

Образцы	Возраст (лет)	Концентрация (пг/мл)	2,5 – 97,5 процентиля (пг/мл)
Случайные мужчины (N=235)	35	166	25 - 325
Случайные женщины (N=95)	30	47	ND – 341
Женщины на 3-й день цикла (N=106)	N/A	75	ND – 273
Женщины после менопаузы (N=20)*	74	ND	ND - 4
Мальчики (N=15)**	11	93	4 - 352
Девочки (N=15)	11	18	ND – 83

ND – недетектируемо

ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Номер лунки	Содержимое лунки	Среднее, ОП	Конц., пг/мл
	стандарты		
A1, A2	A	бланк	0
B1, B2	B	0.05	10
C1, C2	C	0.014	30
D1, D2	D	0.050	100
E1, E2	E	1.19	250
F1, F2	F	2.08	500
G1, G2	G	3.18	1000

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: вышеприведенные данные не должны быть использованы вместо данных, полученных в лаборатории.

ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Все представленные характеристики выражены в пг/мл.

Сравнение методов

Набор Ингибин В Gen II ELISA сравнивался с другим коммерчески доступным методом (метод X). 60 образцов от мужчин и 60 образцов от женщин в возрасте 20-50 лет были проанализированы и получены следующие результаты:

Регрессия:

Ингибин В Gen II = 1.03 (OBI) – 6.77 пг/мл
(r = 0.99; P < 0.0001)

Ингибин В Gen II = 1.57 (DSL-10-84100) + 11.29 пг/мл
(r = 0.97; P < 0.0001)

Рисунки (См. оригинал инструкции).

Восстановление разведения (Линейность)

Четыре образца человеческой сыворотки были разбавлены нулевым стандартом ИНГИБИН В и исследованы.

Образец	Разбавление	Ожидаемая конц. (пг/мл)	Наблюдаемая конц. (пг/мл)	% от Восстановления
I	---	999.80	N/A	N/A
	1 : 2	499.90	492.40	98
	1 : 4	249.95	234.33	94
	1 : 8	124.97	117.66	94
	1 : 16	62.49	59.07	95
II	---	659.78	N/A	N/A
	1 : 2	329.89	319.12	97
	1 : 4	164.95	161.10	98
	1 : 8	82.47	86.54	105
	1 : 16	41.24	46.78	113
III	---	580.15	N/A	N/A
	1 : 2	290.07	256.85	89
	1 : 4	145.04	117.80	81
	1 : 8	72.52	66.31	91
	1 : 16	36.26	37.66	104
IV	---	279.35	N/A	N/A
	1 : 2	139.67	135.08	97
	1 : 4	69.84	68.46	98
	1 : 8	34.92	36.08	103
	1 : 16	17.46	19.67	113

Восстановление после спайка

Добавление 3 разных уровней Ингибина В Gen II к 4 образцам пациентов с низкой концентрацией Ингибина В Gen II дало следующие результаты:

Образец	Эндогенная конц.	Ожидаемая конц. (пг/мл)	Наблюдаемая конц. (пг/мл)	% восстановления
I	46.44	91.85	89.04	97
		133.13	128.47	96
		170.82	166.51	97
II	57.43	102.32	100.86	99
		143.12	132.37	92
		180.38	157.36	87
III	40.18	85.88	83.52	97
		127.43	124.15	97
		165.37	166.80	101
IV	46.18	91.60	91.70	100
		132.89	158.48	119
		170.59	161.84	95

Неточность

Воспроизводимость ИНГИБИН В Gen II ELISA была определена с использованием 3 образцов (Q1, Q2, Q3) и 2 контролей (C1, C2) с 2 партиями реагентов. Анализ состоял из 40 исследований, 3 дублия каждый.

Образец	Средняя конц.	Внутри анализа	Между анализами	Всего
	пг/мл	% CV	% CV	
Q1	19.34	3.82	5.64	6.82
Q2	76.03	2.40	3.68	4.39
Q3	275.30	2.22	3.67	4.29
C1	99.88	2.67	4.70	5.40
C2	363.90	2.46	5.13	5.68

Аналитическая специфичность

Следующие потенциальные кросс - реагенты (Ингибин А, Активин А, Активин В, Активин АВ, АМГ, ФСГ, ЛГ и Фоллистатин 315) были

добавлены в концентрациях, дважды превышающих их физиологические значения, в сывороточный матрикс и проанализированы. Все значения концентрации Ингибина В, полученные в присутствии других кросс-реагентов, были недетектируемые.

Интерференция

При добавлении потенциальных интерферирующих веществ (гемоглобина, триглицеридов, билирубина и Человеческого сывороточного альбумина) в двойной концентрации, концентрации АМН были в пределах $\pm 10\%$ контрольных границ, как представлено в таблице:

Интерферирующие вещества	Конц. анализ	Неразбавленный образец (пг/мл)	Разбавленный образец (пг/мл)	% разницы от контрольного
Гемоглобин	2 мг/мл	102.66	93.91	- 8.5
Триглицериды	20 мг/мл	96.81	99.02	2.3
Билирубин	0.6 мг/мл	91.40	97.06	6.2
Человеческий сывороточный альбумин	60 мг/мл	97.63	103.90	6.4

Предел обнаружения (LoD)

Наименьшее количество Ингибина В в образце, которое может быть обнаружено с 95% вероятностью, составляет 2.6 пг/мл. Значение определялось на основании обработки семи точек калибровочной кривой, контролей и семи образцов сыворотки человека в диапазоне от нуля до 105 пг/мл. Два анализа в день проводили в течение 10 дней в дублях.

Предел количественного определения (LoQ)

Оценочная минимальная доза достигает при 20% общей погрешности 4.8 пг/мл. Значение определялось на основании обработки семи точек калибровочной кривой, контролей и восьми образцов сыворотки человека, по крайней мере, два образца, которые были менее чем медиана нормального и не менее трех образцов, которые были больше, чем средняя норма более 20 постановок и 10 дней в дублях.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com