

ТЕСТ СИСТЕМА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОЇ β -СУБОДИНИЦІ ХОРІОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ ЛЮДИНИ РОЗШИРЕНОГО ДІАПАЗОНУ

10225-300, Free β -Subunit Human Chorionic Gonadotropin-Extended Range (Free β -hCG-XR) Test System

Каталог. №: 10225-300

Методика від 05-06-2014

Кількість : 96

Версія 0

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

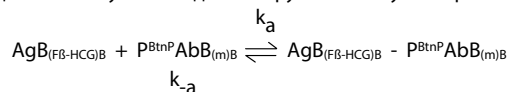
Призначення: Кількісне визначення концентрації вільної бета-субодиниці (β) хоріонічного гонадотропіну в сироватці крові людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричний.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (тип 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотиніловані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотиніловані антитіла до β -HCG. При змішуванні біотинілованих антитіл і сироватки, що містить антиген β -HCG, між β -HCG антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{P}^{\text{BtNP}}\text{AbV}_{(\text{m})\text{B}}$ = Біотиніловані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{AgV}_{(\beta\text{-HCG})\text{B}}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{AgV}_{(\beta\text{-HCG})\text{B}} - \text{P}^{\text{BtNP}}\text{AbV}_{(\text{m})\text{B}}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

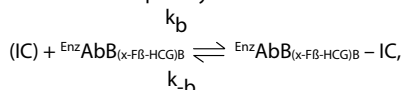
k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

$\text{AgV}_{(\beta\text{-HCG})\text{B}} - \text{P}^{\text{BtNP}}\text{AbV}_{(\text{m})\text{B}} + \text{V}_{\text{BU}}\text{СтрептавідинUB}_{\text{C,W,B}} \Rightarrow$ іммобілізований комплекс (IC)

СтрептавідинUB_{C,W,B} = Стрептавідин, нанесений в лунки

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

Після необхідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антиген-антитіло відокремлюється від не пов'язаних антигенів декантацією або промиванням. Потім додаються інші антитіла (направлені на інший епітоп), мічені ферментом. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків. Відбувається взаємодія мічених ферментом антитіл з комплексом антиген-біотиніловані антитіла на поверхні лунок.



де $\text{E}^{\text{nz}}\text{AbV}_{(\text{x-F}\beta\text{-HCG})\text{B}}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$\text{E}^{\text{nz}}\text{AbV}_{(\text{x-F}\beta\text{-HCG})\text{B}} - \text{IC}$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

Надлишок ферменту видаляється при промиванні. Для розвитку фарбування, вимірюваного за допомогою мікропланшетного спектрофотометра, додають необхідну кількість субстрату. Активність ферменту в лунці прямо пропорційна концентрації нативного вільного антигену у зразку. При використанні декількох різних калібрувальних сироваток з відомими концентраціями антигену, може бути побудована калібрувальна крива, по якій визначають концентрацію антигену в зразках.

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори вільного β -hCG-XR – 1 мл/флакон

6 флаконів референтної сироватки (стандартів) з концентраціями вільного β -hCG-XR 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 100 (E) і 250 (F) нг/мл. Зберігати при 2-8 °C. Містять консерванти.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по Міжнародному стандарту WHO IRP 75/551.

Конверсія одиниць виміру 1 МОД/мл = 1 нг/мл

B. Біотиновий реагент вільного β -hCG-XR – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить біотиніловані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C.

C. Ферментний реагент вільного β -hCG-XR – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені біотиніловані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °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.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

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

F. Субстрат А – 7 мл/флакон

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

G. Субстрат В – 7 мл/флакон

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

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-30 °C.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Розкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. Стабільність набору і компонентів зазначена на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5. 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, 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, NHS.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю в низьких, середніх і високих діапазонах кривої залежності відповіді від дози для моніторингу характеристик 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. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °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.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

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

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C). **Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом**

- 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 °C.**
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл Біотинового реагенту вільного β -hCG у кожную лунку. **Дуже важливо додавати реагенти близько до дна лунок.**
- 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 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 гнучка пляшка, наповнити кожную лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту вільного β -hCG у кожную лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО РЕАГЕНТУ

- Накрийте і інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл 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 гнучка**

пляшка, наповнити кожную лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.

- Додайте по 100 мкл 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 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 (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації вільного β -hCG-XR в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожную з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації вільного β -hCG в мМОД/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Для визначення концентрації вільного β -ХГЛ для невідомого, знайдіть середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину з кривою і зчитайте концентрацію (в нг/мл) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені як зазначено). У наступному прикладі, середня абсорбція (0.737) перетинає криву залежності відповіді від дози при 17,4 нг/мл вільний бета-ХГЛ концентрації (Малюнок 1).

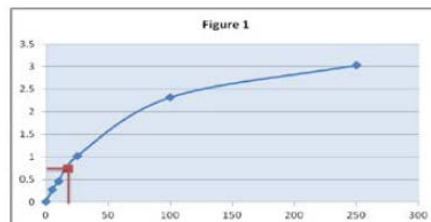
Примітка: програмне забезпечення аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, може бути також використане для відновлення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути встановлена.

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація
Калібратор А	A1	0.007	0.007	0
	B1	0.007		
Калібратор В	C1	0.273	0.270	5
	D1	0.266		
Калібратор С	E1	0.457	0.461	10
	F1	0.465		
Калібратор D	G1	1.003	1.016	25
	H1	1.029		
Калібратор E	A2	2.379	2.315	100
	B2	2.251		
Калібратор F	C2	3.047	3.026	250
	D2	3.004		
Зразок	E2	0.760	0.737	17.4
	F2	0.713		

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

Малюнок 1



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F») ≥ 1.8

- Максимальна Оптична щільність (Калібратор «А») ≤ 0.1
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

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.
- Зразки з концентраціями вільного β -hCG-XR понад 50 нг/мл необхідно розвести (наприклад, 1:10) нормальною чоловічою сироваткою (вільного β -hCG-XR < 1 нг/мл) і проаналізувати повторно. Результат помножити на фактор розведення.
- 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, піпеток, 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 випробувань системи були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки і тест-реагентами може привести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імуноаналізу. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта, а також всіма іншими клінічними даними.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірні.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

У вагітних жінок рівень вільного β -hCG в сироватці швидко зростає (як і рівень інтактного hCG), досягаючи максимального значення близько 60 нг/мл до 8-9 тижнів гестації. Потім поступово падає протягом 11-12 тижнів. Співвідношення вільного β -hCG-XR/інтактний hCG досягає 1% на 5-му тижні вагітності і залишається постійним на рівні приблизно 0.5% у наступні 22 тижні.

Використання вільного β -hCG в комбінації з АФП для скринінгу синдрому Дауна забезпечило більш високу чутливість при більш низькому відсотку хибнопозитивних результатів.

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору вільного β -hCG 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 таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Точність в аналізі (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	24	10.205	0.520	5.1
Рівень 2	24	21.587	1.130	5.2
Рівень 3	24	41.584	1.730	4.2

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.965 пг/лунку. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.0386 нг/мл для даного набору.

14.3 Специфічність

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

Речовина	Перехресна реактивність
Субодинця вільного β -hCG	1.0000
Інтактний hCG	< 0.0001
ФСГ	< 0.0001
ЛГ	< 0.0001
ТТГ	< 0.0001



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



© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»