НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АНДРОСТЕНДІОНУ

12425-300, Androstenedione (ANST) Test System

Каталог. №: ***12425-300*** *Дата випуску інструкції:* ***08-10-2019***
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 співпадати.

1.0 ВВЕДЕННЯ

Призначення використання: Кількісне визначення концентрації андростендіону у сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП *(Див. оригінал інструкції).*

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (ТИП 5):

Основні реагенти, необхідні для твердофазного імуноферментного аналізу, включають іммобілізоване антитіло, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген.

При змішуванні іммобілізованого антитіла, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція конкуренції між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість нерозчинених сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:

$$^{Enz}Ag + Ag + Ab_{C.W.} \underset{k_{-a}}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AgAb_{C.W.} + {}^{Enz}AgAb_{C.W.}$$

$Ab_{C.W.}$ = Моноспецифічне іммобілізоване антитіло (постійна кількість)
Ag = Нативний антиген (змінна кількість)
^{Enz}Ag = Кон'югат Фермент-антиген (постійна кількість)
$AgAb_{C.W.}$ = Комплекс антиген-антитіло
$^{Enz}AgAb_{C.W.}$ = Комплекс Кон'югат Фермент-антиген – Антитіло
k_a = константа швидкості асоціації
k_{-a} = константа швидкості дисоціації
$K = k_a/k_{-a}$ = Постійна рівноваги

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відокремлюється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних еталонів сироватки відомих концентрацій антигену, можна сформувати криву реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію антигену невідомого.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори ANST – 1 мл/флакон
Шість (6) флаконів референсної сироватки для андростендіону в концентраціях 0 (**A**), 0.1 (**B**), 0.3 (**C**), 1.0 (**D**), 3.0 (**E**) та 10.0 (**F**) у нг/мл. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C. Калібратори можна виразити в молярних концентраціях (нмоль/л), помноживши на 3.492. Наприклад: 1 нг/мл x 3.49 = 3.49 нмоль/л

B. Ферментний реагент ANST – 12.0 мл/флакон
Один (1) флакон містить кон'югат ANST (аналог)-пероксидаза хрону (HRP) у білок-стабілізуючій матриці з барвником. Зберігати при температурі 2-8 °C.

C. Пластина, покрита антитілами ANST - 96 лунок
Один мікропланшет із 96 лунками, покритий кролячим IgG, специфічним для андростендіону, та упакований в алюмінієвий пакет із сушильним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

D. Концентрат промивного розчину - 20 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить сурфактант у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

E. Реагент Субстрату - 20 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (TMB) та пероксид водню (H_2O_2) у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.

F. Стоп-розчин - 8 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5M H_2SO_4). Зберігати при температурі 2-8 °C.

G. Інструкція.

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

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

Примітка 3: Вищевказані компоненти призначені для одного 96-лункового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Піпетка здатна подавати обсяги 0.25 мл (25 мкл) та 0.100 мл (100 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (100 мкл) та 0.350 мл (350 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Дозатор (-и) регульованого об'єму 0.050 мл-1.0 мл (50-1000 мкл) для кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
9. Таймер.
10. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту B. 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, HHS.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразки повинні представляти собою кров, сироватку або гепаринізовану плазму за типом, та отримані із звичайними запобіжними заходами при відборі зразків венепункцією. Для точного порівняння для встановлення нормальних значень слід отримати зразки сироватки вранці натще. Кров слід збирати у пробірки для проколювання вен (з добавками гелю або без них) або вакуумні пробірки для плазми, що містять гепарин. Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу у двох примірниках потрібно 0.050 мл (50 мкл) зразка.

Перекладач Тетяна Зеленська

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні в низькому, нормальному та високому діапазоні для моніторингу результатів аналізу. Ці контролі 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.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. **Промивний буфер**
   Розведіть вміст концентрату для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою у відповідній ємності для зберігання. Зберігати розведений буфер при температурі 2-30 °C до 60 днів.

Примітка 1: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).
Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем

1. Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C.
2. Внесіть 0.025 мл (25 мкл) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю або зразка у призначену лунку.
3. Додайте 0.100 мл (100 мкл) ферментного реагенту ANST в кожну лунку.
4. Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування.
5. Накрийте та інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
7. 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 кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте 0.100 мл (100 мкл) розчину субстрату у всі лунки (див. Розділ «Підготовка реагенту»). Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
10. Додайте 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок 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.

Примітка: Розведіть зразки, у яких підозрюється концентрація вище 1000 нг/мл 1:5 та 1:10, калібратором андростендіону '0' нг/мл або пулованої чоловічої сироватки з відомим низьким значенням андростендіону.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації ANST в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
2. Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного калібратора в дублях відповідно до концентрації ANST в нг/мл на лінійному міліметровому папері (перед тим, як складати графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
3. Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
4. Щоб визначити концентрацію ANST для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у нг/мл) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (0.964) перетинає криву реакції на дозу при концентрації ANST 1.14 нг/мл (див. Малюнок 1).

Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ELISA, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

I.D. зразка	Номер лунки	Abs (A)	Середнє Abs (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор A	A1	2.622	2.666	0
	B1	2.710		
Калібратор B	C1	2.365	2.365	0.1
	D1	2.366		
Калібратор C	E1	1.745	1.764	0.3
	F1	1.783		
Калібратор D	G1	1.070	1.085	1.0
	H1	1.103		
Калібратор E	A2	0.493	0.499	3.0
	B2	0.505		
Калібратор F	C2	0.233	0.231	10.0
	D2	0.229		
Пацієнт 1	E2	0.968	0.964	**1.14**
	F2	0.960		

*Наведена вище таблиця та дані нижче є лише для прикладу. Не використовуйте їх для обчислення результатів.

Примітка: Помножте горизонтальні значення на 1000, щоб перетворити на нг/мл.

Малюнок 1

(Див. в оригіналі інструкції).

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Абсорбція (OD) калібратора 0 нг/мл повинна бути ≥ 1.3.
2. Чотири з шести контрольних пулів 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.

Перекладач Тетяна Зеленська

12. Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з 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 тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays" Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. Для дійсних результатів випробувань адекватні засоби контролю та інші параметри повинні відповідати переліченим діапазонам та вимогам до 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'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Відповідно до встановлених контрольних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції та жінок під час гестації, очікувані діапазони для тестової системи Androstenedione AccuBind® ELISA детально описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тестової системи ANST

Дорослі	
Жінки	0.3-2.0 нг/мл
Чоловіки	0.4-1.5 нг/мл

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності "нормальних" людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, сукупності тестованих та 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 власний діапазон значень, використовуючи метод з корінним населенням до району, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність вимірювання тестової системи ANST AccuBind® ELISA в аналізі та між аналізами була визначена за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольних пулованих сироваток. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення (σ) та коефіцієнт варіації (C.V.) для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 2 та таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (значення в нг/мл)

Зразок	N	X	σ	CV%
Низький	12	0.66	0.06	9.1
Нормальний	12	2.28	0.10	4.3
Високий	12	5.76	0.18	3.1

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами (значення в нг/мл)

Зразок	N	X	σ	CV%
Низький	10	0.70	0.07	10.1
Нормальний	10	2.41	0.16	6.6
Високий	10	5.88	0.31	5.3

*Виміряно в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

14.2 Чутливість

Тестова система ANST AccuBind® ELISA має чутливість 0.04 нг/мл.

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність тестової системи Androstenedione AccuBind® ELISA була перевірена шляхом розведення декількох зразків сироватки, що містять високий рівень андростендіону, з референсною сироваткою 0 нг/мл. Було визначено, що система має чудову лінійність із відновленням між 90-110% для трьох зразків, розведених 1:2, 1: 4, 1: 8 та 1:16.

14.3.2 Відновлення

Відновлення тестової системи ELISA ANST AccuBind® було розраховано для трьох зразків пацієнтів з додаванням 0.5, 1.0, 2.0 та 5.0 нг/мл андростендіону. Було визначено, що відновлення становить 10% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.4 Специфічність

Перехресну реакційну здатність антитіла андростендіону 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 андростендіону, необхідною для витіснення тієї ж кількості кон'югату.

Субстанція	Перехресна реактивність
Андростендіон	100.000
Тестостерон	0.235
5α-Дигідротестостерон	0.033
Прогестерон	0.047
ДГЕА сульфат	0.005
Кортизол	< 0.001
Альдостерон	< 0.001
Естрадіол (17α чи β)	< 0.001
Естріол	< 0.001
ДГЕА сульфат	0.005
Прегненолон	< 0.001

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»

Перекладач Тетяна Зеленська