

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОГЕСТЕРОНУ МЕТОДОМ ІФА

Progesterone Test System

Кат. №: 4825-300А

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 7



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

1.0 ВСТУП

Призначення: Кількісне визначення концентрації Прогестерону в людській сироватці або плазмі за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

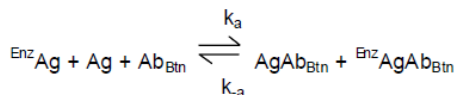
2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (ТИП 7):

Реагенти, що вимагаються для твердофазного імуноферментного аналізу, включають антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між нативним антигеном зразка та кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{Btн}}$ = біотинильовані антитіла (постійна кількість)

Ag = нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{Btн}}$ = комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btн}}$ = комплекс кон'югат-антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_a = константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_a$ = константа рівноваги

Відбувається реакція між біотином, пов'язаним з антитілами і стрептавідином, іммобілізованим в лунках мікропланшетів. Це дозволяє відокремити фракцію, пов'язану з антитілами, при декантації або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btн}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btн}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}} \Rightarrow$ Іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}} =$ Стрептавідин, іммобілізований в лунках іммобілізований комплекс = «сендвіч»-комплекс, пов'язаний з твердою фазою (поверхнею лунок)

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будуватиметься калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

А. Калібратори Прогестерону - 1 мл (мл)/флакон

Сім флаконів референсної сироватки для Прогестерону з концентраціями 0 (А), 0,3 (В), 2,0 (С), 5,0 (D), 15 (E), 30 (F) та 60,0 (G) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містить консерванти. Калібратори можуть бути виражені в молярних концентраціях (нМ/л (nM/l)) множенням на коефіцієнт 3.18.

Наприклад: 1 нг/мл (ng/ml) x 3.18 = 3.18 нМ/л (nM/l)

В. Ферментний реагент Прогестерону - 6 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить кон'югат Прогестерону (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині, з червоним барвником. Зберігати при 2-8 °C (°C).

С. Біотиновий реагент Прогестерону - 6 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до Прогестерону, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, жовтий барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл (µg/ml) стрептавідину і запакований в фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ПАР в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон

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

G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. 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 та компонентів зазначені на етикетці.

Зауваження 3: Перераховані реагенти для одного 96-лункового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 та 50 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 та 350 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери перемінного об'єму 200-1000 мкл (µl) для розведення кон'югату
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm)
6. Фільтрувальний папір для просушування планшета
7. Поліетиленова плівка чи кришка для інкубації мікропланшета
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання
9. Таймер
10. 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, ВРС і поверхневого антигена 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 Publication No. (CDC) 88-8395.

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

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать кров, сироватка або гепаринова плазма за типом; дотримуватись звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для порівняння з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натщесерце. Зберіть кров в пробірки для венепункції з червоною кришкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірку з ЕДТА або гепарином для плазми. Дозвольте крові згорнутись (для сироватки). Відцентрифугуйте зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити зразок натщесерце.

Зразки можуть бути охолоджені до 2-8 °C (°C) на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.050 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю відповідно з низьким, нормальним і високим діапазоном для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик поставлених реагентів. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або деградацію реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

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

Примітка: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають ознаки росту бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

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

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть смужки, які не використовуються, в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8°C (°C).
2. Додайте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (μl)) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Ферментного кон'югату Прогестерону в кожну лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 10-20 секунд.
5. Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Біотинового Реагенту Прогестерону в усі лунки.
6. Добре перемішайте мікропланшет протягом 10-20 секунд.
7. Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
8. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
9. Додайте 350 мкл (μl) буфера для промивок (див. розділ «Підготовка 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 (уникайте утворення повторних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити ще 2 рази.
10. Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

11. Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
12. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте лунки 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.
13. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 60 нг/мл (ng/ml) необхідно розвести в 5 або 10 разів «0» калібратором Прогестерону або чоловічою пуловою сироваткою з відомо низькою концентрацією Прогестерону.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Прогестерону 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 кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації Прогестерону в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
4. Визначте невідомі концентрації Прогестерону у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної

щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.517 перетинає стандартну криву при 8.1 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

Примітка: Програмне забезпечення для аналізу даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для аналізу даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити програмне забезпечення.

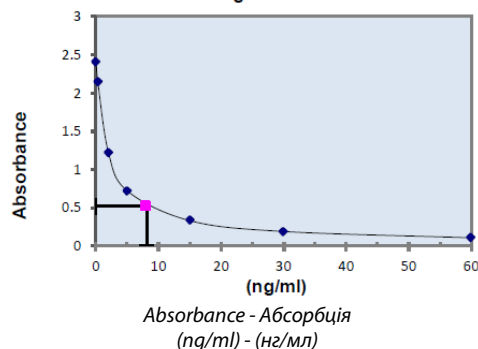
Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл (ng/ml))
Калібратор A	A1	2.420	2.406	0
	B1	2.391		
Калібратор B	C1	2.155	2.137	0.3
	D1	2.119		
Калібратор C	E1	1.248	1.215	2.0
	F1	1.183		
Калібратор D	G1	0.721	0.719	5.0
	H1	0.717		
Калібратор E	A2	0.338	0.330	15.0
	B2	0.322		
Калібратор F	C2	0.187	0.188	30.0
	D2	0.190		
Калібратор G	E2	0.107	0.105	60.0
	F2	0.104		
Пацієнт 1	G3	0.525	0.517	8.1
	H3	0.510		

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

Малюнок 1

Figure 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

1. Оптична густина Калібратора 0 нг/мл (ng/ml) повинна бути ≥ 1.8 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні впадати в установлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризиків для цього продукту доступні на запит від Monobind Inc.

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. 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.

- Правильне і точне дозування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Зразки з концентрацією вище 60 нг/мл (ng/ml) необхідно розвести в 5 або 10 разів «0» калібратором Прогестерону або чоловічою пулованою сироваткою з відомо низькою концентрацією Прогестерону.
- 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 - як того вимагає Директива 98/79/ЄС з маркування CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна отримати, надіславши запит електронною поштою на адресу Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реаكتивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних досліджень», Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю 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 невірно.
- 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 ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених контрольних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції та жінок під час гестації очікувані інтервали для тест-системи для визначення Прогестерону AccuBind® ІФА детально описані в таблиці 1. Під час вагітності рівень Прогестерону сироватки швидко піднімається до кінця третього триместру.

Таблиця 1
Очікувані значення для тест-системи Прогестерону

	(нг/мл (ng/ml))	(нмоль/л (nmol/l))
Діти, до пубертатного віку (1-10 років)	0.07-0.52	0.2-1.7
Дорослі чоловіки	0.13-1.22	0.4-3.88
Дорослі жінки		
Фолікулярна фаза	0.15-1.40	0.5-4.4
Лютеїнова фаза	2.0-25.0	6.4-79.5
Вагітні жінки		
Перший триместр	7.25-90.0	23-286
Другий триместр	19.5-91.0	62-289
Третій триместр	49.0-422.0	153-1342
Жінки, постменопауза	0.0-0.80	0.0-2.55

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, тестованої популяції і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору для визначення Прогестерону всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Число, значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	0.65	0.100	15.3
Нормальний	20	10.77	0.405	3.8
Високий	20	24.94	1.528	6.1

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	0.72	0.065	8.9
Нормальний	20	10.88	0.846	7.5
Високий	20	24.05	1.534	6.4

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.105 нг/мл (ng/ml) для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл (ng/ml)) плюс 2σ (σ - стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним хемілюмінесцентним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом Прогестерону (діапазон значень < 0.15-128 нг/мл (ng/ml)). Загальне число зразків було 60. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	14.59	$y = -1.223 + 1.018(x)$	0.989
Референсний	15.53		

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

Перехресні реакції антитіл з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин у різних концентраціях до сироваткової матриці. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність
Прогестерон	100.000
17ОН-Прогестерон	0.375
Андростенедіон	0.158
Кортизон	0.014
Кортикостерон	0.347
Кортизол	0.005
Даназол	0.003
Дигідротестостерон	0.006
ДГЕА-С	0.002
Естрадіол	0.004
Естрон	0.003
Естріол	0.002
Преднізон	0.023
Тестостерон	0.015



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

