

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ 17 α -ОН ПРОГЕСТЕРОНУ

5225-300, 17 α -ОН Progesterone Test System

Каталог. №: 5225-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 08-08-2013

Версія 4



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 використання: Набір призначений для кількісного визначення концентрації 17 α -ОН Прогестерону в людській сироватці або плазмі імуноферментним методом, колориметричним.

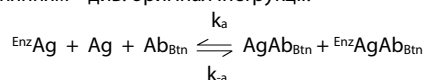
2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний ферментний імуноаналіз (ТИП 7):

Необхідні для ІФА реагенти включають: антитіла, кон'югат фермент-антиген, нативний антиген.

При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається конкурентна реакція між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість зв'язуючих сайтів антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням – див. оригінал інструкції.



Ab_{Btn} = Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

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

AgAb_{Btn} = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = Комплекс кон'югат - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a / k_{-a}$ = константа рівноваги

Одночасно відбувається реакція між біотином, прикріпленим до антитіл, і стрептавідином, прикріпленим до мікролунок. Це дозволяє відділити зв'язану фракцію антитіл після декантації/аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ – іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею

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

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори 17 α -ОНР – 1 мл/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для 17 α -ОН Прогестерону з концентраціями 0 (A), 0.1 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.5 (E) та 10 (F) нг/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містить консерванти. Концентрації стандартів можуть бути виражені в молях (нМоль/л) множенням на коефіцієнт 3.03.

Наприклад: 1 нг/мл \times 3.03 = 3.03 нМоль/л

B. Ферментний Реагент 17 α -ОНР – 1 мл/флакон

Один флакон, що містить кон'югат 17 α -ОН Прогестерону (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині з барвником. Зберігати при 2-8 °С.

C. Буфер стероїдного кон'югату – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить буфер, червоний барвник, консервант та інгібітори зв'язування протеїнів. Зберігати при 2-8 °С.

D. Біотиновий реагент 17 α -ОНР – 6 мл/флакон

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до 17 α -ОН Прогестерону, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, блакитний барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °С.

E. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

F. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °С.

G. Розчин субстрату – 12 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5 M H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °С.

I. Інструкція.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Перераховані реагенти для одного 96-луноквого мікропланшета.

Зауваження 3: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °С. Стабільність набору і компонентів ідентифікована на етикетці.

4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 та 50 мкл з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери перемінного об'єму 200-1000 мкл для розведення кон'югату
4. Мікропланшетний вошер
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм
6. Фільтрувальний папір для просушування планшета
7. Пластикові 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, 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, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечно видалення компонентів набору повинно відповідати місцевим нормативним вимогам.

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи гепаринової плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівняваності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натще. Зберіть кров в пробірки для венепункції з червоною кришечкою 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.

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

- Робочий розчин ферментного реагента** – стабільний протягом 1 року.
Відміряйте 0.7 мл Ферментного реагенту 17-ОН Прогестерон і внесіть у флакон, що містить буфер стероїдного кон'югату. Розчин зберігається при 2-8 °С.
- Промивний розчин**
Розведіть вміст концентрату промивного буферу до 1000 мл дистильованою чи деіонізованою водою в придатній посудині. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °С до 60 днів.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він виглядає голубим.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим фахівцем****

- 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 °С.
- Додайте по 0.025 мл (25 мкл) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 0.050 мл (50 мкл) Ферментного Реагенту 17α-ОН Прогестерону в кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Додайте по 0.050 мл (50 мкл) Біотинового реагенту 17α-ОН Прогестерону в кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл буфера для промивок (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 (уникайте повітряних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл розчину субстрату в кожен 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 СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл 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.
- 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.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 20 нг/мл необхідно розвести, 1:1 та 1:5 «0» стандартом або чоловічою сироваткою з відомою низькою концентрацією 17-ОН Прогестерону.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації 17α-ОН Прогестерону в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

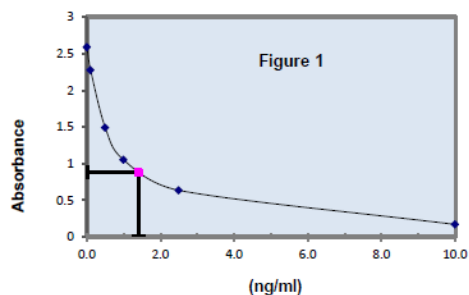
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації 17α-ОН Прогестерону в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
- Визначте невідомі концентрації 17α-ОН Прогестерону у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.880 перетинає стандартну криву при 1.41 нг/мл (див. мал.1)

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.586	2.586	0
	B1	2.586		
Калібратор В	C1	2.276	2.275	0.1
	D1	2.274		
Калібратор С	E1	1.509	1.486	0.5
	F1	1.463		
Калібратор D	G1	1.069	1.049	1.0
	H1	1.030		
Калібратор E	A2	0.642	0.634	2.5
	B2	0.626		
Калібратор F	C2	0.172	0.169	10.0
	D2	0.166		
Пацієнт 1	A3	0.876	0.880	1.41
	B3	0.884		

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

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

- Оптична густина Калібратора 0 нг/мл повинна бути ≥ 1.3
- Чотири з шести контролів якості повинні вкладатися в установлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS і форма аналізу ризику для цього продукту доступні за запитом від компанії Monobind Inc.

12.1 Якість 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.
- 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 професіоналами.**

- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- 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 розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для "нормальної" дорослої популяції і жінок при вагітності очікувані значення при використанні даного методу ELISA наведені в таблиці:

Таблиця 1

Очікувані значення для тест-системи 17 α -ОН Прогестерону

	нг/мл	нмоль/л
Діти в препубертаті (1-10 років)	0.2-0.8	0.64-2.54
Дорослі чоловіки	0.2-3.1	0.64-9.86
Дорослі жінки		
Фолікулярна фаза	0.2-1.3	0.64-4.13
Лютетінова фаза	1.0-4.51	3.18-14.34
Жінки постменопауза	0.2-0.9	0.64-2.86

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 17 α -ОН 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)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	0.94	0.06	8.5%
Нормальний	20	3.25	0.22	6.7%
Високий	20	7.38	0.43	5.8%

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	0.88	0.07	8.0%
Нормальний	10	3.12	0.24	7.7%
Високий	10	7.55	0.48	6.4%

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах на протязі 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.077 нг/мл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл) плюс 2 σ (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 17 α -ОН Прогестерону (діапазон значень < 0.15 - 128 нг/мл). Загальне число зразків було 66. 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

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	3.49	$y = 0.2232 + 1.065 (x)$	0.957
Референсний	3.19		

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
17 α -ОН Прогестерону	100.000
Прогестерон	0.375
Андростенедіон	0.158
Кортизон	0.014
Кортикостерон	0.347
Кортизол	0.005
Даназол	0.003
Дигідротестостерон ДНЕА-сульфат	0.006
Естрадіол	0.002
Естрон	0.004
Естріол	0.003
Преднізон	0.002
Тестостерон	0.023
РФ	0.015
	менш 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

