

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АФП, ХГЛ ТА НЕКОН'ЮГОВАНОГО ЕСТРІОЛУ

8525-300, Alpha-Fetoprotein, β -Human Chorionic Gonadotropin, Unconjugated Estriol (AFP/hCG/uE3 VAST®) Triple Screen Panel Test System

Каталог. №: **8525-300**

Методика від **15-04-2013**

Кількість : **192**

Версія **3**

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. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення Концентрації Альфа-Фетопротеїну (АФП), β -хоріонічного Гонадотропіну людини (ХГЛ) і некон'югованого Естріолу (uE3) в сироватці і плазмі за допомогою мікропланшетного імуоферментного аналізу, колориметричний.

2. ВСТУП

Моніторинг концентрації ХГЛ, АФП і uE3 з регулярними інтервалами вважається дуже важливим для визначення нормального розвитку плоду. Загальна інформація на основі цих трьох аналізів (Triple Screen) надає клініцисту комплексну картину розвитку здорового плоду та здоров'я матері. Будь-яка аномалія, яка спостерігається в першому триместрі вагітності, може бути виправлена, якщо вона не є причиною якоїсь генетичної аномалії. Monobind забезпечує клініциста одним інструментом для моніторингу всіх трьох аналітів, використовуючи 0,125 мл (125 мкл) сироватки пацієнта (0,050 мл (50 мкл) для АФП, 0,050 мл (50 мкл) для uE3 та 0,025 мл (25 мкл) для ХГЛ) в одному 75-хвилинному комбінованому аналізі.

Альфа-Фетопротеїн (АФП) - це глікопротеїн з молекулярною масою 70 кДа. АФП, як правило, виробляється гепатоцитами, ембріональним жовтковим мішком та, меншою мірою, шлунково-кишковим трактом під час розвитку плоду. Концентрації сироватки досягають найвищого рівня за дванадцять тижнів вагітності. Цей піковий рівень поступово зменшується до менш ніж 25 нг/мл до одного року після пологів. Після цього рівні знижуються до менш ніж 10 нг/мл. Наявність аномально високої концентрації АФП у вагітних жінок вважається маркером ризику для відкритих дефектів нервової трубки (ONTDs).

Підвищені рівні АФП виявляють у пацієнтів з первинними гепатомами та жовчовивідними пухлинами. АФП є найбільш корисним маркером для діагностики та лікування гепатокарциноми.

Концентрація хоріонічного гонадотропіну (ХГЛ) у крові та сечі різко зростає під час нормальної вагітності. ХГЛ секретується плацентарною тканиною, починаючи з примітивного трофобласту, майже з моменту імплантації, і служить для підтримки жовтого тіла протягом перших тижнів вагітності.

ХГЛ або аналогічні до ХГЛ глікопротеїни також можуть вироблятися різноманітними трофобластними і не трофобластними пухлинами. Вимірювання ХГЛ, аналітичними системами з відповідною чутливістю та специфікою, має велике значення при виявленні вагітності та діагностиці ранніх порушень вагітності.

Згідно з літературою, концентрації біологічно активного (ненасиченого) ХГЛ в сироватці та сечі виявляються вже через 10 днів після овуляції, досягаючи 100 мМОд/мл до перших пропущених місячних. Концентрація зростає експоненціально в першому триместрі, вдвічі збільшуючись майже кожні 48 годин до піку (від 50000 до 200000 мМОд/мл) до кінця першого триместру. Потім спостерігається поступове зниження, що досягає приблизно однієї п'ятої піку і залишається на цьому рівні до кінця вагітності.

Некон'югований Естріол у сироватці вагітних жінок походить майже виключно з речовин-попередників у плода через плаценту.³ Клінічні дані показують, що при неускладненій вагітності виробництво естріолу постійно зростає протягом останнього триместру; проте при вагітності, ускладненій плацентарною недостатністю, синтез естріолу швидко знижується. Протягом багатьох років найбільш часто використовуваним методом моніторингу

синтезу естріолу (як індекс до стресу плоду) є вимірювання естріолу та кон'югату естріолу у зразку добової сечі.⁴ Проте зміни в очищенні нирок та добових варіаціях можуть викликати підозру при підрахунку результатів цих досліджень. В останні роки дослідники виявили визначення некон'югованого естріолу в плазмі під час вагітності як альтернативу аналізу сечі в якості кращого маркера стресу плоду.⁶ Аномально низькі рівні естріолу у вагітної жінки може вказувати на проблему з розвитком дитини. Рівні естріолу у невагітних жінок значно не змінюються після менопаузи, а рівні не відрізняються суттєво від рівнів у чоловіків.⁷

Тестова система Потрійна Скринінгова Панель VAST® AccuBind® ELISA дозволяє вимірювати не тільки АФП, але також ХГЛ та uE3. Тест є більш точним та є скринінгом додаткових генетичних розладів. Загалом, комбінований тест визначить > 60% дітей з синдромом Дауна та 80-90% дітей з дефектами нервової трубки. Ця опція не була доступною, особливо в країнах, що розвиваються, із звичайними тестуваннями, такими як ультразвукове дослідження.¹¹

У цьому методі комбінований калібратор (що містить різні рівні АФП, ХГЛ та E3), зразок пацієнта або контроль спочатку вносяться в лунку з нанесеним стрептавідином. Додаються біотинильовані моноклональні та ферментно-мічені антитіла (спрямовані проти різних епітопів АФП і ХГЛ) та змішуються. Реакція між різними специфічними для аналізу антитілами та нативним аналітом утворює сендвіч-комплекс, який зв'язується зі Стрептавідином, що нанесений в лунках. У випадку з uE3, аналог E3, кон'югований з HRP (фермент), додається, а потім - специфічне біотинильоване антитіло E3. Між міченими E3 та нативними E3 відбувається конкуренція за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл.

Після завершення необхідного інкубаційного періоду надлишок ферментно-міченого антитіла або аналога вимивається на етапі промивання. Додавання відповідного субстрату призводить до забарвлення. В ХГЛ та АФП інтенсивність кольору прямо пропорційна концентрації, тоді як в E3 вона зворотно пропорційна концентрації аналіту.

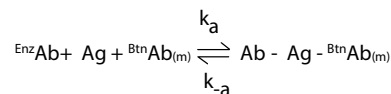
Застосування декількох референтних сироваток з відомими рівнями ХГЛ, АФП і E3 дозволяє побудувати криву «доза-відповідь» активності та концентрації. При порівнянні з кривою невідома концентрація зразка може бути інтерпольована.

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуоферментний аналіз - (ТИП 3 для ХГЛ - АФП)

Необхідні реагенти для імуоферментного аналізу включають антитіла високої спорідненості і специфічності (ферментні і іммобілізовані), з різними чітким розпізнаванням епітопів, в надлишку, і нативний антиген, біотинильовані (АФП/ХГЛ) антитіла.

Після додавання біотинильованих антитіл, міченого ферментом антитіла і сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілами, без конкуренції або стеричної невідповідності, з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням для АФП і ХГЛ.



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{CM}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{c.w.} = Стрептавідин, нанесений в лунку

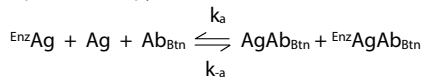
Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантациєю або промиванням. 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.

Конкурентний імуноаналіз - Тип 7 (для uE3)

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

Стрептавідин_{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. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються для 2x96 Мікропланшетів:

A. Калібратори для потрійного скринінгу - 1 мл/флакон (ліофілізовані)

Розведіть кожен флакон з 1 мл дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні протягом 1 (одного) року при 2-8 °С.

Калібратор	АФП, нг/мл	ХГЛ, мМОд/мл	tPSA, нг/мл
A	0	0	0
B	10	10	0.5
C	25	25	1.0
D	75	50	2.5
E	150	100	10
F	400	250	20
Кат. №	1 ^{-ий} IRP 72/225	3 ^{-ий} IS 75/537	uE3 підготовлений гравіметрично з 99+% чистих препаратів

uE3 калібратори можуть бути виражені в молярних концентраціях (нМ/л) шляхом множення на 3.45.

Наприклад: 1 нг/мл x 3.45 = 3.45 нМ/л

B. Ферментний Реагент АФП – 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить мічені ферментами антитіла і біотинильовані мишачі моноклональні IgG в буфері, жовтий барвник, консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

C. Ферментний Реагент ХГЛ – 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить мічені ферментами антитіла і біотинильовані мишачі моноклональні IgG в буфері, синій барвник, консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

D. Ферментний Реагент uE3 – 6 мл/флакон

Один (1) флакон містить кон'югат Естріол (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в стабілізуючій білкової матриці з червоним барвником. Зберігати при температурі 2-8 °С.

E. Біотиновий Реагент uE3- 6 мл/флакон

Один (1) флакон містить мічені біотином специфічні біотинильовані очищені кролячі IgG в буфері, синій барвник і консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

F. Планшет, покритий Стрептавідином - 2x96 лунок

Два 96-луноквих мікропланшета, покритих Стрептавідином і запакованих в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

G. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

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

H. Розчинник зразка - 75 мл/флакон

Один (1) флакон містить нормальну людську сироватку вільну від ХГЛ, стабілізовану консервантами.

I. Субстрат А – 2x7 мл/флакон

Один (1) флакон містить тетраметилбензидин (ТМБ) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °С.

J. Субстрат В – 2x7 мл/флакон

Один (1) флакон містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °С.

K. Стоп-розчин – 2x8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

L. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С.

Зауваження 3: Реагенти достатні для використання набору з 192 лунками; дивись таблицю на останній сторінці для 96-луноквого набору.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 25, 50 і 100 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 бутылка (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 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.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка або гепаринова плазма різних типів, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. При тестуванні в дублях необхідно 0.050 мл (50 мкл) зразка для всіх трьох (3) параметрів.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. 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 буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. Підготовка зразків: Для зразків ХГЛ* (перший триместр), розведення повинні бути зроблені таким чином:

Внести 0.5 мл (500 мкл) розчинника зразка в пробірку і додати 0.025 мл (25 мкл) зразка пацієнта. Змішати на вортексі. (Розведення 1:21). Взяти 0.025 мл (25 мкл) з розведення (1:21) та внести в іншу пробірку, що містить 1.0 мл (1000 мкл) розчинника зразка (1/41) (кінцеве розведення 1:861). Провести аналіз на розведення 1:861 і помножити результати на коефіцієнт розведення 861.

*Якщо проводиться аналіз ХГЛ від нормальних популяцій, розведення не потрібне, якщо ХГЛ пацієнта не більше, ніж 250 мМОд/мл.

3. Робочий розчин - Стабільний протягом одного (1) року.

Вилийте вміст бурштинового флакона розчину 'A' в прозорий флакон з розчином 'B'. Закрийте жовтим ковпачком для полегшення ідентифікації. Змішайте і маркуйте відповідним чином. Зберігати при 2 - 8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий 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 контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

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

1. 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.

2. Внесіть 0.025 мл (25 мкл) відповідного сироваткового референтного матеріалу, контролю або зразка (розведеного для ХГЛ) у відповідні лунки.

(Для АФП та ХГЛ):

3. а) Додайте 0.100 мл (100 мкл) відповідного Ферментного реагенту у відповідні лунки. Дуже важливо використовувати правильний «Ферментний Реагент» для кожного аналізу для отримання точних результатів.

(Для uE3):

б) Додайте 0.050 мл (50 мкл) у ферментного реагенту U-естриолу в усі лунки. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.

в) Додати 0.050 мл (50 мкл) з біотинового реагенту антитіл U-естриолу в усі лунки. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.

4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.

5. Інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.

6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.

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

8. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку. 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

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.

10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну 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.

11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референтній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації кожного аналіта в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть абсорбцію, отриману з роздруківки мікропланшетного трієдра, як описано в Прикладі 1.

2. Відкласти абсорбцію кожного дубліката стандартної сироватки проти концентрації відповідного маркера у відповідних одиницях на міліметровій (не визначати середнє дублікатів стандартів сироватки перед відкладенням).

3. Побудувати найбільш підходящу криву.

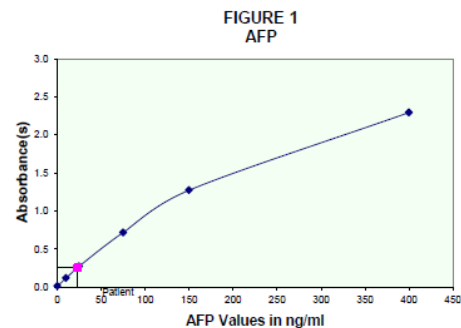
4. Для визначення концентрації відповідного пухлинного маркера для невідомих зразків, знайти середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину з кривою і зчитати концентрацію у відповідних концентраціях (нг/мл для АФП і uE3 і мМОд/мл для ХГЛ*) з горизонтальної осі графіка. (дублікати невідомого можуть бути усереднені як зазначено). У наступному прикладі, середнє поглинання дублікатів невідомого зразка 0.256 перетинає АФП DRC при концентрації 22.9 нг/мл (малюнок1 і приклад 1).

*Регулярний моніторинг рівнів ХГЛ при вагітності демонструє ріст по експоненті і, таким чином, перевищуються верхні межі кривої. Для отримання достовірних результатів необхідно розвести зразки.

ПРИКЛАД 1 (АФП)

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація нг/мл
Калібратор А	A1	0.015	0.015	0
	B1	0.015		
Калібратор В	C1	0.115	0.120	10
	D1	0.126		
Калібратор С	E1	0.256	0.277	25
	F1	0.298		
Калібратор D	G1	0.697	0.720	75
	H1	0.743		
Калібратор E	A2	1.221	1.274	150
	B2	1.326		
Калібратор F	C2	2.200	2.293	400
	D2	2.386		
Пацієнт	E2	0.253	0.256	22.9
	F2	0.258		

*Дані, наведені в прикладах і малюнках, призначені тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

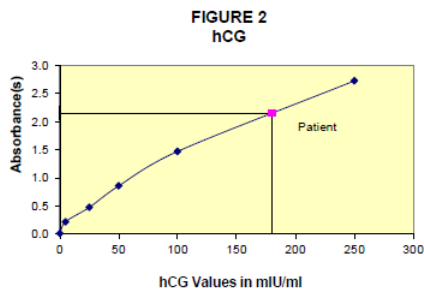


ПРИКЛАД 2 - ХГЛ

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація мМОд/мл
Калібратор А	A1	0.014	0.015	0
	B1	0.015		
Калібратор В	C1	0.222	0.220	10
	D1	0.217		
Калібратор С	E1	0.474	0.475	25
	F1	0.477		
Калібратор D	G1	0.855	0.857	50
	H1	0.860		
Калібратор	A2	1.488	1.470	100

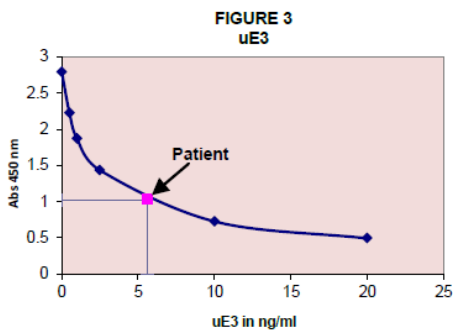
E	B2	1.452		
Калібратор F	C2	2.707	2.724	250
	D2	2.741		
Розведений зразок Пацієнта 1:1071	E2	0.483	0.476	25.7*
	F2	0.468		

*Концентрація зразка пацієнта = $25.7 \times 861 = 22,128$ мМОд/мл



ПРИКЛАД 3 – uE3

Взірець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація нг/мл
Калібратор A	A1	2.765	2.790	0
	B1	2.815		
Калібратор B	C1	2.219	2.226	0.5
	D1	2.235		
Калібратор C	E1	1.872	1.870	1.0
	F1	1.868		
Калібратор D	G1	1.416	1.434	2.5
	H1	1.451		
Калібратор E	A2	0.711	0.727	10.0
	B2	0.743		
Калібратор F	C2	0.482	0.493	20.0
	D2	0.503		
Пацієнт	E2	1.037	1.028	5.2
	F2	1.019		



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Для АФП & ХГЛ поглинання (OD) калібратора 'F' має бути ≥ 1.3 .
- Для uE3 поглинання калібратора 'A' має бути ≥ 1.3 .
- Чотири з шести контрольних пулів 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.
- 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 бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для тестових процедур були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
- 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 відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- АФП має низьку клінічну чутливість і специфічність як пухлинний маркер. Клінічно, тільки підвищені значення АФП не мають діагностичного значення в якості тесту на рак і повинні бути використані тільки в поєднанні з іншими клінічними проявами (спостереженнями) і діагностичними параметрами. Рівень АФП, як відомо, підвищений в ряді доброякісних захворювань і станів, включаючи вагітність і доброякісні захворювання печінки, такі як гепатит і цироз.
- Повна історія пацієнта та клінічна інформація від всіх пов'язаних джерел повинна розглядатись перед прийняттям будь-якого диференційного діагнозу. Жоден тест або метод не є достатнім, щоб гарантувати правильність важливого клінічного рішення.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ (АФП, СЕА і tPSA)

Значення АФП, ХГЛ і uE3 для нормального, здорового населення і вагітних жінок, під час циклу вагітності, наведені в таблиці 1 і 2. Значення, наведені нижче, представляють результати обмежених досліджень в межах лабораторії відповідно до опублікованої літератури.

ТАБЛИЦЯ 1
(Нормальні значення ХГЛ під час вагітності)

HCG	Normal Male/Female	< 5.7 mIU/ml
During Normal gestation (mIU/ml)		
1 st Week		10 – 30
2 nd Week		30 – 100
3 rd Week		100 – 1000
4 th Week		1,000 – 10,000
2 nd & 3 Month		30,000 – 350,000
2 nd Trimester		10,000 – 30,000
3 rd Trimester		5,000 – 15,000

ТАБЛИЦЯ 2
Середні значення під час вагітності

Gestation (Week)	AFP (ng/ml)	hCG (IU/ml)	uE3 (ng/ml)
15	40.14	40.88	0.68
16	42.91	33.87	0.87
17	52.34	28.71	1.17
18	61.50	26.74	1.51
19	75.57	18.76	1.91
20	83.31	19.24	2.02
21	90.46	23.46	2.78

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватись на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1.1 Точність (АФП)

Точність даного тесту всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контрольних об'єднаних сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (σ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 3-8.

ТАБЛИЦЯ 3
Точність в аналізі АФП в нг/мл

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	20	33.1	1.85	5.6
Рівень 2	20	140.5	7.45	5.3
Рівень 3	20	230.5	10.45	4.5

ТАБЛИЦЯ 4
Точність між аналізами* АФП в нг/мл

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	31.5	1.75	5.6
Рівень 2	10	135.8	8.54	6.3
Рівень 3	10	244.5	9.58	3.9

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.1.2 Точність (ХГЛ)

ТАБЛИЦЯ 5
Точність в аналізі ХГЛ в мМОд/мл

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	20	2.8	0.15	5.4
Рівень 2	20	15.2	0.65	4.2
Рівень 3	20	178.0	10.50	5.9

ТАБЛИЦЯ 6
Точність між аналізами* ХГЛ в мМОд/мл

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	3.1	0.17	5.5
Рівень 2	10	15.4	0.81	5.3
Рівень 3	10	185.6	11.10	6.0

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.1.3 Точність (uE3)

ТАБЛИЦЯ 7
Точність в аналізі uE3 в нг/мл

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	24	1.58	0.13	8.3
Рівень 2	24	5.17	0.37	7.1
Рівень 3	24	9.06	0.59	6.5

ТАБЛИЦЯ 8
Точність між аналізами* uE3 в нг/мл

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 2	10	1.47	0.14	9.5
Рівень 2	10	4.93	0.39	7.9
Рівень 3	10	8.99	0.54	6.0

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

14.2 Чутливість

Чутливість визначали шляхом запуску 20 повторів '0' калібратора. 2SD середнього розраховували з кривої доза-відповідь.

ТАБЛИЦЯ 9

Analyte	Sensitivity/Sample	Sensitivity/ml
AFP (ng/ml)	0.025 ng/T	1.0 ng/ml
HCG	0.02 mlU/T	0.8 mlU/ml
uE3	2.9 pg/T	0.115 ng/ml

14.3 Достовірність

Дану тест-систему для АФП порівнювали з референтним методом. Аналізували біологічні зразки в концентраціях від 2.5 до 601 нг/мл. Загальна кількість зразків становить 301. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для АФП ELISA в порівнянні зі звичайним методом. Отримані дані представлені в таблиці 10.

ТАБЛИЦЯ 10 (АФП)

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	6.60	$x = -0.7514 + 0.9639 (y)$	0.978
Метод порівняння	6.43		

Дану тест-систему для ХГЛ порівнювали з референтним методом. Аналізували біологічні зразки від нормального населення та вагітних жінок. Загальна кількість зразків становить 110. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для ХГЛ ELISA в порівнянні зі звичайним методом. Отримані дані представлені в таблиці 10.

ТАБЛИЦЯ 11 (ХГЛ)

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	14.8	$y = 0.081 + 0.93x$	0.989
Метод порівняння	15.1		

Дану тест-систему для uE3 порівнювали з референтним методом. Аналізували біологічні зразки з низьким, нормальним і високим рівнями uE3 (значення варіювали від 0.15 – 29.1 нг/мл). Загальна кількість зразків становить 58. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для ХГЛ ELISA в порівнянні зі звичайним методом. Отримані дані представлені в таблиці 12.

ТАБЛИЦЯ 12 (uE3)

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	3.84	$y = -0.1744 + 0.9794 (x)$	0.952
Метод порівняння	3.74		

Тільки незначні розбіжності між даним аналізом і еталонним методом свідчать про близькість середніх значень. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Інтерференції не було виявлено при проведенні аналізів з використанням даної тест-системи з додаванням великої кількості наступних речовин в об'єднану сироватку людини. У разі виникнення перехресної реакції, зазначається % перехресної реакції.

Cross Reactant	AFP	hCG	uE3
AFP	100%	10 µg/ml	10 µg/ml
HCG	10 IU/ml	100%	NT*
uE3	NT*	NT*	100%
ASA**	100µg/ml	100µg/ml	100µg/ml
Ascorbic Acid	100µg/ml	100 µg/ml	100µg/ml
CEA	10 µg/ml	10 µg/ml	NT*
PSA	1.0µg/ml	1.0µg/ml	NT*
HLH	10 IU/ml	10 IU/ml	NT*
TSH	100mIU/ml	100mIU/ml	NT*
PRL	100µg/ml	100µg/ml	NT*
Estriol	NT*	NT*	100%
Androstenedione	NT*	NT*	10µg/ml
Cortisol	NT*	NT*	1.0 mg/ml
Cortisone	NT*	NT*	10 µg/ml
Corticosterone	NT*	NT*	10 µg/ml
DHEA-S	NT*	NT*	100 µg/ml
DHT	NT*	NT*	100 µg/ml
Estradiol	NT*	NT*	10 ng/ml
E-3 Sulfate	NT*	NT*	0.62%
Prednisone	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
Progesterone	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
Spirolactone	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
Testosterone	NT*	NT*	10 µg/ml

**ASA = Acetylsalicylic Acid. NT* = Not Tested

14.5 Лінійність & Хук-ефект

Велику кількість відповідних аналітів розводили в об'єднаній людській сироватці і тестували в лінійних розведеннях для перевірки хук-ефекту системи антитіл, що використовується в даній тест-системі. Результати представлені нижче в таблиці 13.

ТАБЛИЦЯ 13

Analyte	Maximum Dose
AFP	100,000 ng/ml
HCG	100,000 mIU/ml
uE3	1000 ng/ml



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



**ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР
ТА
УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК В УКРАЇНІ:**

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

