

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛОБУЛІНУ, ЩО ЗВ'ЯЗУЄ СТАТЕВІ ГОРМОНИ (SHBG)

9125-300, Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) Test System

Каталог. №: 9125-300

Методика від 04-10-2013

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. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення концентрації глобуліну, що зв'язує статеві гормони (SHBG) в сироватці за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

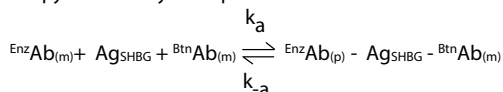
2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані моноклональні антитіла анти-SHBG.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

Ag_{SHBG} = Нативний антиген (змінна кількість)

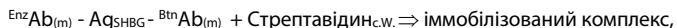
$\text{EnzAb}_{(m)}$ = ферментно-мічене поклональне антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(m)} - \text{Ag}_{\text{SHBG}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = 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 лунки

Імобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

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

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори SHBG – 1 мл/флакон

Шість (6) флаконів референтної сироватки з концентраціями 0 (A), 10 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 250 (F) нмоль/л. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

B. Ферментний Реагент SHBG – 12 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить анти-людський конюгат SHBG-HRP і біотинильований анти-SHBG людини в білковій стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

C. Розчинник SHBG – 60 мл/флакон

Один (1) флакон білкової стабілізуючої матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

D. Планшет, покритий Стрептавідином – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

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

F. Субстрат А – 7 мл/флакон

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

G. Субстрат В – 7 мл/флакон

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

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

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

I. 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: 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 300 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, HHS.

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

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка 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 пробірки 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. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

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. Робочий Субстратний розчин – Стабільний протягом одного року

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.

3. Розведення зразка пацієнта (1/21)

Додати по 0.025 мл (25 мкл) кожного зразка пацієнта в 0.500 мл (500 мкл) розчинника сироватки. Накрити і ретельно перемішати перевертанням. Зберігати при температурі 2-8 °C протягом до сорока восьми (48) годин.

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

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

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.
**Потребується розведення зразка пацієнта - дивіться розділ 8.0 Підготовка реагентів.*
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту SHBG в кожен лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти близько до дна лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.
- Інкубувати протягом 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 бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен 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

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен 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 проводить при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

10. РЕЗУЛЬТАТИ

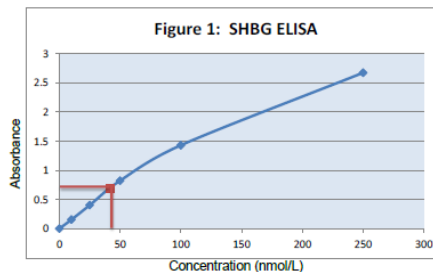
Для визначення концентрації SHBG в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації SHBG в нмоль/л (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації SHBG в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.698 перетинає стандартну криву при 42.06 нмоль/л (див. мал.1)

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація нмоль/л
Калібратор А	A1	0.005	0.006	0
	B1	0.007		
Калібратор В	C1	0.161	0.160	10
	D1	0.159		
Калібратор С	E1	0.404	0.407	25
	F1	0.409		
Калібратор D	G1	0.826	0.826	50
	H1	0.826		
Калібратор E	A2	1.425	1.433	100
	B2	1.441		
Калібратор F	C2	2.689	2.674	250
	D2	2.658		
Зразок 1	A3	0.717	0.698	42.06
	B3	0.679		

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



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора А повинна бути ≤ 0.1 .
- Оптична щільність Калібратора F повинна 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 процедур з використанням AccuBind® ELISA 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.
- Концентрації сироваткового SHBG залежать від безлічі факторів: в тому числі, якщо пацієнт сенсифікований, скільки разів пацієнт піддався впливу специфічного алергену і т.д. Тільки концентрація загального SHBG не є достатньою для оцінки клінічного статусу. Всі клінічні результати, особливо специфічне тестування на алергії, слід брати до уваги при визначенні клінічного стану пацієнта.
- Вся відповідна клінічна інформація повинна бути прийнята до уваги, перш ніж приймати будь-які рішення для пацієнтів, які можуть бути в межах норми.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених довідкових інтервалів для "нормального" населення очікувані діапазони для тестової системи AccuBind® ELISA SHBG докладно описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи AccuBind® ІФА SHBG

POPULATION	RANGE
Males	10 – 57 nmol/L
Females (non-pregnant)	18 – 144 nmol/L

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 Точність

Точність набору SHBG всередині серії визначалася в аналізі двадцяти повторів кожної з трьох об'єднаних сироваток (низького, середнього і високого діапазону кривої доза-відповідь). Була отримана точність 1.5 – 2.6 %.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нмоль/л)

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Контрольний Рівень 1	24	18.331	0.764	4.2
Контрольний Рівень 3	24	49.516	2.128	4.3

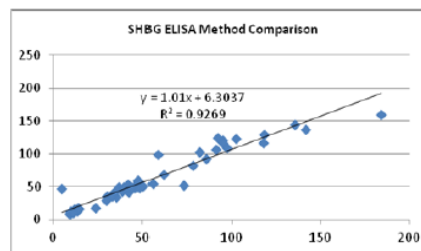
2				
Контрольний Рівень 3	24	83.955	4.799	5.7

14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється при визначенні варіабельності 0 нмоль/л калібруатора сироватки і з використанням 2σ (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Дана система має чутливість 0.0122 нмоль/л.

14.3 Достовірність

Тест-систему ІФА SHBG AccuBind® порівнювали з референтним методом. Біологічні зразки з рівнями SHBG в низькому, середньому і високому діапазонах були використані; значення коливалися від 4,6 до 184,0 нмоль/л. Загальна кількість досліджених препаратів 60. Дані наведені в таблиці 3.



ТАБЛИЦЯ 3

Parameter	Monobind	Reference
Low	8.86	4.6
High	160.39	184.02
Mean	56.09	49.79
Intercept	1.01	
Slope	6.3037	
Corr (R ²)	0.9269	

14.4 Специфічність

Специфічність тест-системи SHBG AccuBind® ELISA до тісно пов'язаних імуноглобулінів оцінювалася шляхом їх додавання у подвоєній фізіологічній концентрації в матрицю сироватки.

ТАБЛИЦЯ 4

SUBSTANCE	Cross Reactivity
Corticosteroid Binding Globulin	< 0.3
Thyroxine Binding Globulin	< 0.08



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

