

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМЮЛЛЕРОВОГО ГОРМОНУ МЕТОДОМ ІФА

Anti-Müllerian Hormone (AMH) Test System

Кат. №: 9725-300A

Дата випуску інструкції: 27-10-2022

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 ВВЕДЕННЯ

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

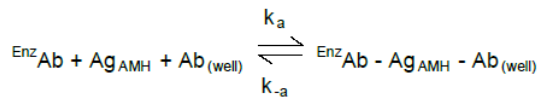
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод рівноваги типу сендвіч (ТИП 2):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні мікропланшетних лунок через взаємодію антитіла х-АМГ, нанесеного в лунці.

При змішуванні міченого ферментом антитіла х-АМГ (окремий епітоп) та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном та антитілами, без конкуренції та стеричних перешкод, з утворенням сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



де $\text{Ab}_{(\text{лунка})}$ = антитіла, нанесені в лунку (надлишкова кількість)

Ag_{AMH} = нативний антиген (змінна кількість)

EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{AMH}} - \text{Ab}_{(\text{лунка})}$ = сендвіч-комплекс антиген-антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Після необхідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антиген-антитіло відокремлюється від не пов'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох сироваткових референсів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори АМГ - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізовані) - Значки [A - F]
6 флаконів референтного матеріалу для АМГ з рівнями 0 (A), 0.2 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 5.0 (E) і 15.0 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C).
Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Розведені калібратори стабільні протягом 10 днів при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аліквотуйте відновлені калібратори у крио-флакони та зберігайте при -20 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУЙТЕ/РОЗМОРОЖУЙТЕ БІЛЬШЕ ДВОХ РАЗІВ.** Додано консервант.

Примітка: Калібратори на основі людської сироватки простежуються за референтним препаратом з кодом NIBSC 16/190.

- B. Контролі АМГ - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізовані) - Значки [M&N]**
Два (2) флакони референтних контролів для АМГ. Зберігати при 2-8 °C (°C). **Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Розведені контролі стабільні протягом 10 днів при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аліквотуйте відновлені калібратори у крио-флакони та зберігайте при -20 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУЙТЕ/РОЗМОРОЖУЙТЕ БІЛЬШЕ ДВОХ РАЗІВ.** Додано консервант.
- C. Ферментний реагент АМГ - 6 мл (мл)/флакон - Значок**
Один (1) флакон містить реагент кон'югату анти-АМГ. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- D. Планшет з нанесеним АМГ - 96 лунок - Значок**
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антитілом х-АМГ. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон - Значок**
Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. Розділ Приготування реагенту.
- F. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон - Значок S^N**
Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон - Значок**
Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5 M (M) H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C (°C).
- H. Інструкція**

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Не піддавайте реактиви впливу тепла, сонця або сильного світла.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для 96-лункового планшета. Для інших конфігурацій набору зверніться до таблиці в кінці інструкції.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) та 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Всі продукти, що містять сироватку людини, протестовані методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС 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 відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками повинна бути сироватка або плазма за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в звичайну пробірку з червоним ковпачком для венепункції без добавок або антикоагулянтів для сироватки або пробірки, що містять ЕДТА/гепарин, для плазми. Дозвольте крові згорнутися для зразків сироватки. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Якщо зразок (и) неможливо аналізувати одразу після забору крові, зразок (зразки) може зберігатися при температурі 2-8 °C (°C) до семи (7) днів або -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування (максимум два цикли заморожування/розморожування перед використанням). Для аналізу в дублях потрібно 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях низького, середнього та високого діапазонів кривої відповідності дози для контролю ефективності 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 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

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

Примітка: 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 (°C)).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).
- Внесіть по 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) ферментного реагенту АМГ в кожен лунку. Дуже важливо розподілити всі реагенти поблизу дна лунки з покриттям.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, закрийте та інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 0.350 мл (ml) (350 мкл (µl)) 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 пляшка-дозатор, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) субстрату ТМБ 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 СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) 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 (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 15 нг/мл (ng/ml) слід проводити розведення в сироватці або плазмі людини з низькими значеннями АМГ і відповідно помножити на коефіцієнт розведення. Прийнятними розріджувачами є сироватка жінок у постменопаузі (<0.1 нг/мл (ng/ml) АМГ), калібратор «0» та інші розчини-розріджувачі, які продає Monobind.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації АМГ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації АМГ в нг/мл (ng/ml) на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію АМГ для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у нг/мл (ng/ml)) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (0.299) перетинає криву реакції на дозу при концентрації АМГ 1.33 нг/мл (ng/ml) (див. Малюнок 1).

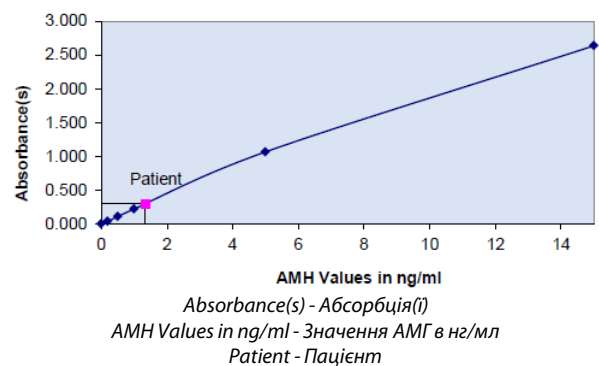
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	0.005	0.005	0
	B1	0.005		
Калібратор В	C1	0.041	0.043	0.20
	D1	0.045		
Калібратор С	E1	0.109	0.112	0.50
	F1	0.115		
Калібратор D	G1	0.215	0.225	1.0
	H1	0.234		
Калібратор Е	A2	1.047	1.068	5.0
	B2	1.097		
Калібратор F	C2	2.570	2.635	15.0
	D2	2.678		
Пацієнт	E2	0.300	0.299	1.33
	F2	0.298		

*Дані, наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

Малюнок 1



*Якщо показання поглинання виходять за межі шкали або вище, ніж середнє поглинання найвищого калібратора, зразок слід повторити з розведенням.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F») ≥ 1.3
- 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

- 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 - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою за Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими 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 розраховувані значення стандартне не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Реагенти для процедур тестової системи AccuBind® IFA 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.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рівні АМГ вимірювали за допомогою Тест-системи АМГ Accubind® у явно нормальних жінок різних вікових груп. Отримані значення наведені в таблиці 2.

Таблиця 2
Референсні діапазони для тестової системи АМГ, жінки

Вікова група	N	Середнє значення (нг/мл (ng/ml))	Медіана (нг/мл (ng/ml))	Мінімум (нг/мл (ng/ml))	Максимум (нг/мл (ng/ml))
20-29	24	5.95	5.94	1.77	12.41
30-39	80	2.83	2.47	0.11	12.67
40-49	38	1.33	0.59	0.02	9.77

Очікувані значення для чоловіків та жінок неперевіраних вікових груп, визначені літературними джерелами, зібрані в таблиці 3⁶.

Таблиця 3
Додаткові контрольні діапазони для тестової системи АМГ

Чоловіки	Діапазон (нг/мл (ng/ml))
< 24 місяці	14-466
2 - 12 років	7.4-243
> 12 років	0.7-19
Жінки	
< 24 місяці	< 4.7
2 - 12 років	< 8.8
13 - 19 років	0.9-9.5

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, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником лише до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон із використанням методу з корінним населенням місцевості, в якій розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність аналізу Тестової системи АМГ AccuBind® Microplate IFA була визначена шляхом аналізу на шести різних рівнях пулового контролю та сироватках пацієнта. Середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Дані точності для тестової системи АМГ

Зразок	Середнє значення (нг/мл (pg/ml))	Точність в аналізі		Загальна точність (n = 80)	
		SD	CV%	SD	CV%
Контроль 1	0.80	0.02	2.87	0.04	5.32
Контроль 2	4.54	0.12	2.60	0.24	5.24
Контроль 3	14.16	0.30	2.11	0.77	5.47
Пацієнт 1	1.42	0.03	2.20	0.08	5.79
Пацієнт 2	0.30	0.02	5.69	0.03	9.46
Пацієнт 3	9.57	0.26	2.73	0.51	5.36

*Виміряно в сорока експериментах в дублях протягом 20 днів.

14.2 Чутливість

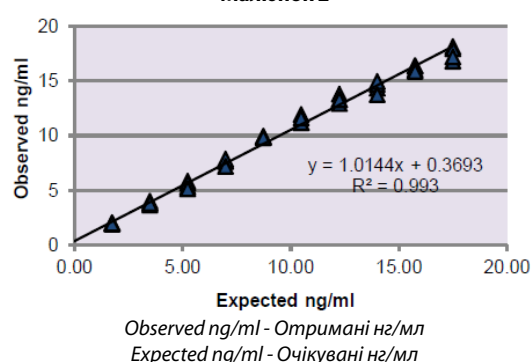
Тестова система Intact АМГ Accubind® IFA має LoB = 0.024 нг/мл (ng/ml) і LoD = LoQ = 0.044 нг/мл (ng/ml).

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність Тестової системи АМГ Accubind® IFA була перевірена шляхом розведення зразків сироватки людини, що містять високий рівень АМГ (від 2 до 17.5 нг/мл (ng/ml)), низький вміст АМГ (< 0.2 нг/мл (ng/ml)) у зразках сироватки людини. Система забезпечує відмінну лінійність у діапазоні тесту до 17.5 нг/мл (ng/ml), як показано на малюнку 2.

Малюнок 2

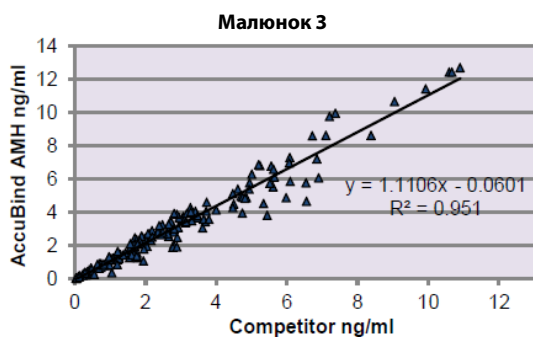


14.3.2 Відновлення

Відновлення Тест-системи АМГ AccuBind® Microplate IFA було розраховано для п'яти зразків пацієнтів із додаванням 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 та 8.0 нг/мл (ng/ml) АМГ. Було визначено, що відновлення було в межах 15% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.3.3 Порівняння методів

Тест-система АМГ AccuBind® Microplate ІФА була спочатку оцінена на 167 пацієнтах з відомими концентраціями АМГ, розрахованими за допомогою іншої тест-системи АМГ від іншого виробника. Кореляція між двома методами відмінна з коефіцієнтом $R^2 = 0.951$. Графік даних показаний на малюнку 3.



14.4 Перехресна реактивність

Наступні аналіти були протестовані і виявлено, що вони не реагують з набором.

Аналіт	Концентрація	% Реакційна здатність
Фолікулостимулюючий гормон	100 мМО/мл (mIU/ml)	< 0.001
Хоріонічний гонадотропін людини	1000 мМО/мл (mIU/ml)	< 0.001
Лютетінізуючий гормон	200 мМО/мл (mIU/ml)	< 0.001
Пролактин	100 нг/мл (ng/ml)	< 0.001



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 Поїнт 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

