



НАБОР ИФА для определения АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

Каталог. № : EIA-3647
Кол-во анализов: 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 11-06-2012
Версия 6.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения адренокортикотропного гормона (АКТГ) в плазме человека. Данный анализ предназначен для диагностического применения *in vitro*.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор является двухстадийным иммуно-ферментным анализом для измерения биологически активной цепочки АКТГ, состоящей из 39 аминокислот. Козлиное поликлональное антитело к человеческому АКТГ, очищенное аффинной хроматографией, и мышинное моноклональное антитело к человеческому АКТГ являются специфическими к определенным зонам молекулы АКТГ. Одно антитело приготовлено для связывания только С-концевыми аминокислотами АКТГ 34-39, и эти антитело является биотинилированным. Другое антитело приготовлено для связывания только средних зон и N-концевых аминокислот АКТГ 1-24, и это антитело для определения помечено пероксидазой хрена.

Лунка стрептавидина – биотинилированный анти-АКТГ (34-39) – АКТГ – HRP конъюгированный анти-АКТГ (1-24)

В данном анализе калибраторы, контроли и образцы пациентов одновременно инкубируются с антителом, меченым ферментом, и двухслойным биотиновым антителом в лунке микропланшета, покрытой стрептавидином. После инкубации, микролунки промываются для удаления несвязанных компонентов и фермент, связанный к твердой фазе, инкубируется с субстратом (ТМВ). Затем добавляется стоп раствор кислоты для остановки реакции и изменения цвета на желтый. Интенсивность желтого цвета прямо пропорциональна концентрации АКТГ в образце. Кривая отклика дозы единицы абсорбции против концентрации выстраивается путем использования результатов калибраторов. Концентрации АКТГ, присутствующего в контролях и образцах пациентов определяются непосредственно из этой кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Компоненты	Количество
Реагент 1 - Биотинилированное антитело АКТГ (афинно очищенный козлий анти-человеческий АКТГ)	1x2,7 мл
Реагент 2 - Пероксидазой (ферментом) меченное антитело АКТГ (мышинное моноклональное анти-человеческий АКТГ)	1x2,7 мл
Реагент А ИФА - Промывочный концентрат (солевой раствор с ПАВ)	1x30 мл
Реагент В ИФА - Субстрат ТМВ	1x15.5 мл
Реагент В ИФА - Стоп раствор (1N серная кислота)	1x20 мл
Микротитрационные лунки - Один держатель с полосками, мечеными стрептавидином.	12x8-луночных полосок
Калибраторы (А-Ф) - Лиофилизированный (кроме нулевого калибратора) синтетический ч-АКТГ. Нулевой калибратор (раствор BSA/раствор сыворотки лошади) в жидкой форме, готовая к использованию. Все другие калибраторы содержат синтетический ч-АКТГ (1-39) в растворе BSA/сыворотки лошади.	1x4 мл для нулевого калибратора 1x2 мл для всех других калибраторов
Контроли 1 и 2 - Лиофилизированные контроли, 2 уровня, синтетический ч-АКТГ	1x2 мл на уровень

(1-39) в растворе BSA/растворе сыворотки лошади.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный ридер.
- Микропланшетный промыватель (если промыватель не доступен, можно использовать ручное промывание).
- Прецизионные пипетки для внесения 25, 200, 100 и 150 мкл.
- (необязательно) Многоканальный дозатор или многоразовый дозатор на 25, 100 и 150 мкл.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Все реагенты, поставляемые в этом наборе, специально разработаны таким образом, чтобы не содержать компонентов человеческой крови, человеческих образцов, которые могут быть положительными к антителам HBsAg, HBeAg или ВИЧ, должны рассматриваться как потенциально инфекционные и биологически опасные. При обращении необходимо соблюдать общепринятые предосторожности, применяемые к любому непроверенному образцу пациента. Стоп раствор содержит 1N серную кислоту. Это сильная кислота. Даже разбавленная, она очень сильная. Она может вызвать ожог, поэтому, при работе используйте перчатки и защитную одежду. В случае проливания необходимо промыть большим количеством воды. Не вдыхайте испарений.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться плазма ЭДТА. Для анализа в двойном экземпляре необходимо 400 мкл ЭДТА плазмы. Соберите кровь в ЭДТА пробирку. Плазма должна быть немедленно отделена, желательнее в охлажденной центрифуге, и храниться при -20°C или ниже. Образцы ЭДТА плазмы могут храниться при $2-8^{\circ}\text{C}$ до 8 часов. Для хранения до 4 месяцев, заморозьте их до -20°C .

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните все компоненты при $2-8^{\circ}\text{C}$ кроме промывочного концентрата и стоп раствора.

1. Все реагенты, кроме ненулевых калибраторов, контролей набора и промывочного концентрата готовы к использованию. Храните все реагенты при $2-8^{\circ}\text{C}$, кроме промывочного концентрата, что должен храниться при комнатной температуре до разбавления для предотвращения осада.
2. Для каждого ненулевого калибратора (калибраторы В-Ф) и контроля 1 и 2, разведите каждый флакон 2 мл дистиллированной воды и смешайте. Выдержите флакон 10 минут и потом легко смешайте до полного растворения. **Используйте калибраторы и контроли как можно быстрее после разбавления. Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования.** Стандарты и контроли стабильны при -20°C 6 недель после разбавления, при использовании не более 3 циклов замораживания и размораживания как рекомендовано в разделе «Процедурные замечания».
3. Иммуноферментный реагент А – промывочный концентрат: тщательно перемешайте содержимое промывочного концентрата. Если присутствует осадок в концентрате через хранение при низкой температуре, растворите его (для этого поместите флакон в 37°C водяную баню) или в жаровой шкаф, вращая или помешивая его. Добавьте промывочный концентрат (30 мл) к 570 мл дистиллированной или деионизированной воды и смешайте. Разбавленный промывочный раствор стабилен 90 дней при хранении при комнатной температуре.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Поместите достаточное количество стрептавидин покрытых полосок в держатель и анализируйте 6 АКТГ калибраторов, А-Ф АКТГ КАЛИБРАТОРОВ (точная концентрация указана на этикетке), плазму контроля качества и образцы пациента.
2. Добавьте **200 мкл** образца в обозначенные лунки. **Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования.**
3. Добавьте или внесите **25 мкл** реагента 1 (биотинилированное антитело) в каждую лунку, которая уже содержит образец.
4. Добавьте или внесите **25 мкл** реагента 2 (антитело, меченное ферментом) в каждую лунку. Накройте микропланшет алюминиевой фольгой для предотвращения попадания света и поместите его на орбитальный встряхиватель или вращающее устройство, установленный на **170 ± 10 об/мин**, на **4 часа \pm 30 минут** при комнатной температуре ($22-28^{\circ}\text{C}$).

- Сначала аспирируйте жидкость полностью и потом промойте / аспирируйте каждую лунку 5 раз рабочим моющим раствором (приготовленным из реагента А), используя автоматический микропланшетный промыватель. Объем промывочного раствора необходимо установить для внесения 0,35 мл в каждую лунку.
- Добавьте или внесите **150 мкл** иммуноферментного реагента В (ТМВ субстрат) в каждую лунку.
- Используя соответствующее накрытие для предотвращения попадания света, поместите микропланшет на орбитальный встряхиватель или вращающее устройство, установленный на **170±10 об/мин**, на **30±5 минут** при комнатной температуре (22-28°C).
- Добавьте или внесите по **100 мкл** реагента С (стоп раствора) в каждую лунку, легко смешайте.
- Считайте абсорбцию раствора в лунках в течении 10 минут, используя микропланшетный ридер при **450 нм** против 250 мкл дистиллированной или деионизированной воды.
Считайте планшет снова ридером **при 405 нм** против дистиллированной или деионизированной воды.

Примечание: Второе считывание предназначено для установки аналитической оценки калибровочной кривой для величины, представленной наивысшим калибратором, равным приблизительно 500 пг/мл. Следовательно, образцы пациентов с уровнем АКТГ > 150 пг/мл могут быть вычислены на калибровочной кривой, что содержит считывания до концентрации равной наивысшему калибратору, что используется при 405 нм считывании, от длины волны максимальной абсорбции. В основном, образцы пациентов и контроли должны считываться при использовании считывания при 450 нм для концентрации АКТГ до 150 пг/мл. Концентрация АКТГ выше 150 пг/мл должна интерполироваться, используя 405 нм считывание.

- При использовании конечной абсорбции, полученной на предварительном этапе, постройте калибровочную кривую через кубический сплайн, 4 параметровую логистику или интерполяцию от точки до точки для количественного определения АКТГ.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- АКТГ 1-39 является очень неустойчивой молекулой. Проводите анализ немедленно после разведения или оттаивания всех калибраторов, контролей или образцов пациента.
- Рекомендуется анализ калибраторов, контролей и образцов в двойном экземпляре. Средние единицы абсорбции двойным экземпляром должны использоваться для уменьшения данных и вычисления результатов.
- Образцы должны пипетироваться в лунки при минимальном образовании пузырей. Для достижения этого «вращайте пипетку» как описано в инструкции производителя пипеток.
- Образцы пациентов со значением выше наивысшего калибратора (калибратора F), что равно приблизительно 500 пг/мл (точная концентрация указана на этикетке флакона), могут быть разбавлены калибратором А (нулевым калибратором) и проанализированы повторно. Умножьте результаты на фактор разбавления.
- Не меняйте реагенты разных лотов.
- Если можно, смешайте в равных объемах в достаточном количестве для анализа, реагент 1 (биотинилированное антитело) и реагент 2 (энзимно-меченное антитело) в чистой янтарной бутылке. Потом используйте 50 мкл смешанного антитела для каждой лунки. Этот альтернативный метод заменяет этап 3 и 4, потом инкубируйте на орбитальном шейкере.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ручной метод

- Для 450 нм считывания, постройте кривую, используя первые пять калибраторов, например калибраторы А, В, С, D, и E. Для 405 нм считывания, постройте вторую стандартную кривую, используя три калибратора с наивысшей концентрацией, например калибраторы D, E, и F.
- Пометьте концентрацию каждого калибратора, указанные на флаконе в пг/мл. Отложите данные калибровочной кривой на линейной бумаге при концентрации на оси X и соответствующей абсорбции на оси Y.
- Нарисуйте прямую линию между двумя смежными точками. Этот математический алгоритм широко известен как вычисление от точки к точке. Получите концентрацию образца откладывая единицы абсорбции на оси Y и найдите соответствующие концентрации на оси X. Образцы пациентов и контроли должны считываться при 450 нм для концентрации

АКТГ до 150 пг/мл Концентрация АКТГ выше 150 пг/мл должна интерполироваться при 405 нм.

Автоматический метод

Хорошие результаты дают компьютерные программы кубического сплина или 4 параметровой логистики или от точки к точке. Данные образцов при 450 нм (необработанный А.У. считывание против дистиллированной или деионизированной воды). См. таблицу 1 в конце этой инструкции.

Данные образцов при 405 нм (необработанный А.У. считывание против дистиллированной или деионизированной воды). См. таблицу 2 в конце этой инструкции.

Примечание: Представленные данные только для иллюстрации и не должны использоваться как результаты анализа.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольная плазма должна использоваться при каждом анализе. Результаты, полученные при анализе контролей, должны оцениваться при использовании подходящего статистического метода. Результаты анализа, в котором значения контролей находятся за допустимыми границами, считаются недостоверными.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор не показывает побочных эффектов с образцами, обогащенными 20000 пг/мл АКТГ. Образцы с уровнем АКТГ выше, чем наивысший калибратор, однако, должны быть разбавлены и повторно проанализированы для получения корректных величин. Как и другие анализы, что используются как диагностические приложения, результаты АКТГ должны интерпретироваться с осторожностью при соответствии с клинической картиной и другими тестами.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень АКТГ был вычислен данным набором в 83 явно здоровых индивидов. Полученные значения находятся в диапазоне 7,9-66,1 пг/мл. Основываясь на статистических тестах асимметрии и эксцесса, популяция при логарифмическом перенесении, следовало нормальное распределение или распределение Гуссена, как показано в гистограмме. Геометрическое среднее ± 2 стандартных отклонений средних было вычислено 8,3 – 57,8 пг/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность

117 образцов пациентов со значениями АКТГ в диапазоне от 1,5 – 1045 пг/мл были проанализированы DRG ELISA процедурой и Nichols IRMA (иммунорадиометрический анализ). Линейная регрессия дала следующую статистику:

$$\text{DRG ELISA} = 0,976 \text{ IRMA набор} + 4,2 \text{ пг/мл} \quad r=0,995 \quad N=117$$

Чувствительность

Чувствительность или минимально определяемый лимит этого анализа определяется как наименьшее одно значение, которое может быть установлено из нуля при 95% доверительном лимите. Biomerika АКТГ ELISA имеет чувствительность 0,46 пг/мл.

Точность и восстановление

Точность данного анализа была вычислена из 21 повторных определений для каждого из двух образцов.

Вариабельность в анализе

Образец	Среднее значение (пг/мл)	К-во	КВ, %
A	42,2	25	6,71
B	269,9	25	2,27

Общая точность данного анализа была вычислена исходя из данных трех образцов, полученных в 35 разных анализах, с реагентами трех разных лотов, за девятидневный период.

Вариабельность между анализами

Образец	Среднее значение (пг/мл)	К-во	КВ, %
A	42,3	21	7,1
B	287,8	21	6,9

Восстановление

Разное количество АКТГ было добавлено к четырем разным сывороткам пациента для определения восстановления. Результаты показаны в таблице 3 в конце инструкции.

Специфичность и перекрестная реактивность

Перекрестная реактивность в АКТГ была исследована путем добавления в стандарт АКТГ различных материалов. См. таблицу 4 в конце инструкции.

Кинетический эффект анализа

Для определения есть ли систематический кинетический эффект между началом теста и окончанием, три обогащенных сыворотки пациентов, выбранных для представления перекрестной секции концентрации АКТГ, проанализировали через весь планшет или 96 ячеек.

Линейность разбавления образцов пациента: параллелизм

Пять образцов пациента были разбавлены калибратором А (нулевым калибратором). Результаты в пг/мл показаны в таблице 5 в конце инструкции.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

Таблица 1

Лунки микропланшета	Абсорбция 1-го считывания, единицы	Абсорбция 2-го считывания, единицы	Средняя абсорбция, единицы	АКТГ, пг/мл	АКТГ пг/мл – результаты для отчета
Калибратор А	0,020	0,018	0,019		0
Калибратор В	0,077	0,074	0,076		5
Калибратор С	0,221	0,229	0,225		18
Калибратор D	0,624	0,692	0,685		55
Калибратор E	1,802	1,934	1,868		165
Контроль 1	0,417	0,398	0,408	33,5	33,5
Контроль 2	2,868	2,774	2,821	>150	*
Образец 1	0,072	0,078	0,075	4,9	4,9
Образец 2	0,185	0,177	0,181	14,0	14,0
Образец 3	0,495	,491	,493	40,8	40,8
Образец 4	2,090	2,122	2,106	>150	*

*Поскольку считанная концентрация >150 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 405 нм, как показано в таблице данных при 405 нм,

Таблица 2

Лунки микропланшета	Абсорбция 1-го считывания, единицы	Абсорбция 2-го считывания, единицы	Средняя абсорбция, единицы	АКТГ, пг/мл	АКТГ пг/мл – результаты для отчета
Калибратор А	0,011	0,008	0,0095		0
Калибратор D	0,032	0,032	0,032		55
Калибратор E	0,074	0,081	0,078		165
Калибратор F	1,838	1,817	1,828		500
Контроль 1	0,138	0,132	0,135	<150	¶
Контроль 2	0,921	0,894	0,908	256	256
Образец 1	0,030	0,032	0,031	<150	¶
Образец 2	0,068	0,062	0,065	<150	¶
Образец 3	0,165	0,159	0,162	<150	¶
Образец 4	0,663	,677	0,670	188	188

Для образцов при считывании <150 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 450 нм, как показано в таблице данных при 450 нм, Эта практика даст результаты с оптимальной чувствительностью,

Таблица 3

Образец плазмы	Эндогенный АКТГ (пг/мл)	АКТГ добавленный (пг/мл)	Ожидаемая величина (пг/мл)	Измеряемая величина (пг/мл)	Восстановление (%)
А	13,3	50,0	63,3	62,4	99
		100,0	113,5	116	102
В	17,7	50,0	67,7	62,11	92
		100,0	117,7	21,7	103
С	14,8	50,0	64,8	64,2	99
		100,0	114,8	114,2	99
D	27,1	50,0	77,1	67,4	87
		100,0	127,1	119	94

Таблица 4

Перекрестный реагент	Концентрация перекрестного реагента	АКТГ без перекрестного реагента (пг/мл)	АКТГ с перекрестным реагентом (пг/мл)	Изменение АКТГ (пг/мл)	% перекрестной реактивности
АКТГ (1-24)	100 000 пг/мл	62,9	0,8	-62,1	-0,06
	10 000 пг/мл	62,9	5,05	-57,85	-0,58
	1 000 пг/мл	62,9	28,6	-34,3	-3,43
	200 пг/мл	62,9	43,4	-19,5	-9,75
АКТГ (18-39)	5 000 пг/мл	61,2	2	-59,2	-1,2
	2 000 пг/мл	61,2	13,6	-47,6	-2,4
	500 пг/мл	61,2	24,3	-36,9	-7,4
a-MSH	100 000 пг/мл	88,1	65,7	-22,4	-0,02
	10 000 пг/мл	88,1	69,1	-19	-0,19
	1 000 пг/мл	88,1	70,7	-17,4	-1,7
	200 пг/мл	88,1	74,8	-13,3	-6,7
b-ENDORPHIN	100 000 пг/мл	73,8	60,5	-13,3	-0,01
	50 000 пг/мл	73,8	56,9	-16,9	-0,03

Таблица 5

Образец	Разбавление	Ожидаемый пг/мл	Полученный пг/мл	% Полученный / + Ожидаемый
А	Неразбавленный	-	288	-
	1:2	144	150	104
	1:4	72	70,9	98
	1:8	36	35,7	99
В	Неразбавленный	-	468	-
	1:2	234	278	119
	1:4	117	135	115
	1:8	58,5	65,5	112
С	Неразбавленный	-	270	-
	1:2	135	146	108
	1:4	67,5	68	101
	1:8	33,75	33,5	99
D	Неразбавленный	-	336	-
	1:2	168	149	89
	1:4	84	83	99
	1:8	42	47	112
E	Неразбавленный	-	452	-
	1:2	226	268	119
	1:4	113	126	112
	1:8	56,5	68,9	122