

Набор ИФА для определения ИНСУЛИНО-ПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА

Кат. № : EIA-4140
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 02-2012
Версия 5.0

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

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор иммуноферментного анализа DRG IGF-1 600 предоставляет материалы для количественного определения инсулино-подобного фактора роста 1 (IGF-1) в сыворотке в сыворотке.

Клинические применения

Измерение IGF-1 в сыворотке используется для детей при проблемах с ростом, а также для диагностики и мониторинга акромегалии. IGF-1 концентрация изменяется с возрастом, принимаемой пищей и секрецией гормона роста. Единичное базальное определение IGF-1 используется для изучения маленького роста у детей и изучения принимаемой пищей для всех больных пациентов. Для диагностики акромегалии, единичное определение IGF-1 является более надежным, чем случайное определение гормона роста.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор твердофазного ферменто-связанного иммуносорбентного анализа DRG IGF-1 600 ELISA основан на принципе конкурирующего связывания.

Перед тестом образцы пациента и контроли окисляются и нейтрализуются. В данном наборе анти-IGF-1 антитело привито к внутренней поверхности полистироловых ячеек. Предварительно обработанные образцы инкубируются при комнатной температуре с конъюгатом. Лунки промываются и потом инкубируются с энзимным комплексом. Лунки промываются и однокомпонентный хромогенный субстрат (образование ТМВ) добавляется для развития окраса. Абсорбция остановленной реакции считывается микропланшетным считывателем, интенсивность развитого окраса обратно пропорциональна количеству IGF-1, присутствующего в образце.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2б поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшетных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии.

Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.

- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **1 N HCl**, 1 фл., 3 мл, готовый к использованию; для окисления образцов.
2. **1 N NaOH**, 1 фл., 3 мл, готовый к использованию; для нейтрализации.
3. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (делимые) полоски, 96 лунок. Лунки покрыты антителом (моноклональным) анти-IGF-1.
4. **Стандарты (0-6)**, 7 фл., 1 мл.
Концентрации: 0, 5, 10, 50, 150, 300, 600 нг/мл.
Стандарты откалиброваны в соответствии с Международным референтным реагентом для IGF-1, код NIBSC: 87/518.
Конверсия: 1 нг/мл x 0,13 = нмоль/л.
Содержат 0,03% Проклин 300 + 0,005% гентамицина сульфат в качестве консерванта.
5. **Ферментный конъюгат**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию, биотинированный IGF-1.
* Содержит 0,01% MIT и 0,02% BND в качестве консерванта.
6. **Ферментный комплекс**, 1 бут., 20 мл, готовый к использованию.
Комплекс стрептавидина HRP.
7. **Раствор субстрата**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию ТМВ.
8. **Стоп раствор**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию.
Содержит 0,5 M H₂SO₄.
9. **Промывочный раствор**, 1 фл., 30 мл (концентрированный).

Примечание: дополнительный 0 стандарт для разбавления образца предоставляется по запросу.

4.2 Необходимое, но не поставляемое оборудование и материалы

- Микропланшетный откалиброванный считыватель (450 нм ± 10 нм).
- Откалиброванные регулируемые прецизионные микропипетки.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная вода.
- 1,5 мл реакционные емкости (например, Эппендорфа) для подготовки образца (подкисление и нейтрализация).
- Таймер.
- Универсальная индикаторная бумага.

4.3 Хранение и стабильность набора

Во время хранения при 2-8°C не вскрытые реагенты сохраняют свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после этого срока.

Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. После открытия упаковки нужно плотно закрыть ее снова. Открытые микротитровальные лунки сохраняют активность в течении 6 недель если хранить как описано выше.

4.4 Подготовка реагентов

Позвольте всем реагентам и и требуемому количеству полосок достичь комнатной температуры перед использованием.

Промывочный раствор

Разбавьте 30 мл концентрированного промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 2 недель при комнатной температуре.

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая

информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в оригинале инструкции).

4.6 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном анализе может использоваться сыворотка.

Примечание: в плазме наблюдалось значительное сокращение значений.

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Обратите внимание: Образцы, содержащие азид натрия не должны использоваться в анализе.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать пока не произошло полное свертывание. Для пациентов, проходящих антикоагуляционную терапию может потребоваться больше времени для свертывания.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны анализироваться немедленно. Образцы, сдерживаемые более длительное время (до 2 месяцев) должны быть заморожены только раз до -20°C . Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

Если в начальном анализе оказалось, что образец содержит больше чем самый высокий стандарт, образцы могут быть разбавлены 0 стандартом и повторно проанализированы как описано в процедуре анализа. Для вычисления концентраций необходимо принимать во внимание данный коэффициент разбавления:

Пример:

- а) Разведение 1:10 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешать)
 б) Разведение 1:100 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешать).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

- Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры. Реагенты необходимо смешать без образования пены.

- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого этапа пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Подкисление и нейтрализация образцов пациентов и стандартов

1. Внесите 200 мкл образца или стандарта в 1,5 мл емкости (к примеру, емкости Эппендорфа).

Премечание: стандарты, должны быть подкислены и нейтрализованы также согласно процедуре, описанной ниже.

- Добавьте 20 мкл 1 N HCl.
- Хорошо смешайте и оставьте на 15 минут.
- Добавьте 20 мкл 1N NaOH для нейтрализации во все лунки и смешайте раствор.
- После нейтрализации образцы должны иметь значения pH между 7 и 8. Проверьте значение pH универсальной индикаторной бумагой.

6.3 Процедура анализа

Каждая процедура должна включать стандартную кривую.

- Закрепите желаемое количество микротитровальных лунок в штативе.

- Пипеткой внесите **50 мкл** приготовленных (после подкисления и нейтрализации) стандартов, контролей и образцов **НОВЫМ ОДНОРАЗОВЫМ НАКОНЕЧНИКОМ** в соответствующие лунки.
- Добавьте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку. Тщательно перемешивайте в течении **10 секунд**. Полное перемешивание на этом этапе очень важно.
- Инкубируйте **120 минут** при комнатной температуре.
- Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **3 раза** (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшетку над промокающей бумагой для удаления остатков влаги.
- Добавьте **150 мкл** ферментного комплекса в каждую лунку.
- Инкубируйте **60 минут** при комнатной температуре.
- Резко встряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **3 раза** (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшетку над промокающей бумагой для удаления остатков влаги.
- Добавьте **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
- Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
- Остановите ферментативную реакцию путем добавления **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
- Измерьте оптическую плотность каждой лунки **при 450 ± 10 нм** микропланшетным считывателем на протяжении **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.4 Вычисление результатов

- Вычислите значения средней абсорбции для каждого набора стандарта, контролей и образцов пациентов.
- Постройте стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию на оси Y, полученную для каждого стандарта против его концентрации на оси X.
- Используя среднюю абсорбцию для каждого образца, определите соответствующую концентрацию со стандартной кривой. Можно использовать другие методы обработки данных.
- Автоматический метод: результаты данной инструкции были вычислены автоматически с использованием 4 ПЛ кривой. 4-параметровая логистика предпочтительный метод. Другие функции обработки данных могут дать немного другие результаты.
- Концентрация образцов может считываться прямо со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше наивысшего стандарта необходимо дальше разбавить. Для вычисления концентрации, необходимо учитывать этот коэффициент разбавления.

6.4.1 Пример типичной стандартной кривой

Последующие данные предназначены только для демонстрационных целей и не могут использоваться для вкористовываться вместо данных. Полученных во время анализа.

Стандарт	Оптические единицы (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1,94
Стандарт 1 (5 нг/мл)	1,69
Стандарт 2 (10 нг/мл)	1,49
Стандарт 3 (50 нг/мл)	0,93
Стандарт 4 (150 нг/мл)	0,56
Стандарт 5 (300 нг/мл)	0,44
Стандарт 6 (600 нг/мл)	0,33

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свои собственные значения нормы и патологии.

Дети до достижения половой зрелости (3-8 лет): 20-250 нг/мл.

Дети меньшего возраста в низком весе могут демонстрировать значения ниже 50 нг/мл.

Дети в возрасте половой зрелости (11-16 лет): 130-600 нг/мл

Взрослые после достижения половой зрелости: 150-350 нг/мл.

Примечание: уровень IGF-1 может с возрастом немного уменьшаться.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического. Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь непосредственно к производителю или Вашему дистрибьютору.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа в пределах 1,29 – 600 нг/мл.

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была определена из среднего минус 2 стандартных отклонений 20 репликатов анализов 0 стандарта и составила 1,29 нг/мл.

Точность

9.3.1 Точность внутри анализа

Образец	К-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	20	29,04	4,72
2	20	58,94	6,62

9.3.2 Точность между анализами

Образец	К-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	12	28,06	7,22
2	12	57,52	7,79

9.4 Восстановление

Образцы были насыщены известными концентрациями растворов IGF-1 в соотношении 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены путем добавления половины определенных для значений неразведенных образцов и половины значений неизвестных растворов. Процент восстановления был вычислен умножением соотношения измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Добавл. конц. 1:1 (v/v) нг/мл	Получ. конц. (нг/мл)	Ожид. конц. (нг/мл)	Восстановл. (%)
1	0,0	28,9		
	300,0	294,3	314,4	93,6
	150,0	152,4	164,4	92,7
	75,0	77,0	89,4	86,1
	25,0	38,5	39,4	97,6
2	0,0	56,4		
	300,0	334,8	328,2	102,0
	150,0	191,3	178,2	107,4
	75,0	100,0	103,2	96,9
	25,0	46,8	53,2	87,9

Линейность

Образец	Разведение	Получ. конц. (нг/мл)	Ожид. конц. (нг/мл)	Восстановл. (%)
1	Нет	28,9	28,9	
	1:2	13,9	14,4	96,0
	1:4	7,3	7,2	101,3
	1:8	3,8	3,6	104,9
	1:16	1,9	1,8	102,6
2	Нет	56,4	56,4	
	1:2	26,8	28,2	95,0
	1:4	13,3	14,1	94,3
	1:8	6,8	7,1	95,8
	1:16	3,6	3,5	101,1

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Любое неправильное обращение с образцами или изменение этой процедуры анализа может повлиять на результаты.

10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 2 мг/мл), билирубин (до 0,25 мг/мл) и триглицерид (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.1 Влияющие лекарства

До сегодняшнего дня нам не известно никаких веществ (лекарств), которые влияют на измерение IGF-1 в образце.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

В данном анализе не наблюдалось «хук-эффекта»

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

11.2 Терапевтическое заключение

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

11.3 Надежность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора. Любые повреждения при транспортировке набора не являются под ответственностью производителя.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

