

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

7023, ACTH [Adrenocorticotropic Hormone] ELISA

Каталог. № : 7023

Методика от 08-2013

Количество : 96

Производитель: **BIOMERICA INC.,**
(США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ACTH ELISA содержит материалы для количественного измерения адренотропного гормона (АКТГ) в плазме. Данный анализ предназначен только для использования в *in vitro* диагностике.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный набор использует "двухступенчатый" иммуноферментный анализ для измерения биологически активной молекулы АКТГ (39 аминокислотных остатка). Для анализа используются поликлональные козы антигена к АКТГ человека, очищенные методом аффинной хроматографии, и мышинные моноклональные антитела к хорошо охарактеризованному участку молекулы АКТГ. Одни антитела – биотинилированные-специфичны к С-терминальному участку (34-39 аминокислотные остатки) молекулы АКТГ, другие антитела (меченые пероксидазой) специфичны к среднему и N-терминальному участкам АКТГ (1-24 аминокислотные остатки). При проведении анализа стандарты, контроли и образцы пациентов инкубируются одновременно с биотинилированными антителами к АКТГ и фермент-мечеными антителами в микропланшетных ячейках, покрытых стрептавидином. После инкубации и промывки ячейки инкубируются с субстратом ТМБ. Затем добавляется стоп раствор кислоты, определяется количество трансформированного ферментом субстрата. Измеренное поглощение прямо пропорционально концентрации имеющегося АКТГ. Набор стандартов используется для построения точек на стандартной кривой поглощения, по которой могут быть рассчитаны неизвестные концентрации АКТГ.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

Материал	Описание	Количество
Реагент 1	Биотинилированные антитела к АКТГ (аффинно-очищенные антитела к АКТГ человека)	1 x 2.7 мл
Реагент 2	Меченые пероксидазой антитела (мышинные моноклональные антитела к АКТГ человека)	1 x 2.7 мл
ELISA Реагент А	Промывочный раствор (соли с ПАВ)	1 x 30 мл
ELISA Реагент В	ТМВ хромогенный раствор	1 x 15.5 мл
Стоп раствор	1 N р-р серной кислоты	1 x 20 мл
Микро-планшет	Держатель с покрытыми стрептавидином ячейками	8 ячеек x 12 стрипов
Стандарты (проверьте концентрацию по этикеткам флаконов): А: 0 пг/мл В: С: D: E: F:	Флаконы с лиофилизированным синтетическим АКТГ (1-39), (за исключением Стандарта 0), в растворе БСА/лошадиная сыворотка. Стандарт 0 (БСА/лошадиная сыворотка) в жидкой форме, готов для использования.	1 x 4 мл "0" Стандарта 1 x 2 мл для остальных Стандартов
Контроли 1 и 2 (проверьте концентрацию по этикеткам флаконов)	Флаконы с лиофилизированным синтетическим АКТГ (1-39) в растворе БСА/лошадиная сыворотка.	1 x 2 мл для каждого уровня

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер.
- Автоматический микропланшетный вошер
- Полуавтоматическая пипетка на 25, 200, 100 и 150 мкл
- Многоканальный диспенсер на 25, 100 и 150 мкл (не обязательно)

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Хотя компоненты данного набора специально разработаны без содержания компонентов человеческой крови, образцы крови пациентов, которые могут быть позитивными по HBsAg, HBcAg или ВИЧ антителам, должны исследоваться как потенциально опасные. Соблюдайте общие предосторожности, как при обращении с неизвестными образцами. Стоп-раствор содержит 1N серную кислоту. Даже в такой концентрации с ней нужно обращаться с осторожностью. Может вызывать ожоги – при работе пользуйтесь перчатками, очками и защитной одеждой. При попадании промывайте большим количеством воды. Не вдыхайте испарения.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна быть использована плазма с ЭДТА. Необходимый объем ЭДТК-плазмы для анализа в дублях – 400 мкл. Соберите цельную кровь в пробирки с ЭДТА. Немедленно отделите плазму предпочтительно на охлаждаемой центрифуге (2-8°C). Если образец не будет исследоваться немедленно, храните плазму при -20°C или ниже до 4 месяцев, или при 2-8°C до 8 часов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните все компоненты набора при 2-8 °C.

1. Все реагенты, кроме не-0-калибраторов, контролей и концентрата промывочного раствора - готовы к использованию. Храните все реагенты при 2-8 °C.
2. Для каждого не-0 калибратора (калибраторы В-Ф) и контролей набора 1 и 2, разведите каждый флакон 2 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешайте. Выдержите флакон 10 минут и потом перемешайте легкими вращениями для полного смешивания. **Используйте немедленно после растворения.** После разбавления приготовьте аликвоты и храните стандарты и контроли при температуре -2 °C до 6 недель. **После приготовления заморозьте до -20 °C как можно быстрее.** Стандарты и контроли стабильны при -20 °C в течение 6 недель после восстановления до 3 циклов замораживания-оттаивания.
3. **ELISA Реагент А** - Промывочный раствор: Кристаллический осадок в концентрате промывочного буфера (при хранении при температуре ниже 4°C) может быть устранен при нагревании на водяной бане при 37°C или тщательным перемешиванием. Промывочный Раствор готовится добавлением 30 мл концентрата Промывочного раствора в 570 мл деионизированной или дистиллированной воды. Хорошо перемешайте полученный раствор. Промывочный раствор стабилен в течение 90 дней при комнатной температуре в герметично закрытой бутылки.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Поместите необходимое количество стрипов в держатель для анализирования 6 калибраторов, контролей и образцов пациентов.
2. Пипеткой перенесите **200 мкл** образцов в соответствующие лунки планшета. **Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее.**
3. Пипеткой внесите **25 мкл** Реагента 1 (антител, конъюгированных с биотином) в каждую ячейку, которая уже содержит образец.
4. Пипеткой внесите **25 мкл** Реагента 2 (-ферментного конъюгата) в каждую лунку. Закройте планшет алюминиевой фольгой. Инкубируйте ячейки **на шейкере** при 170±10 об/мин при комнатной температуре (22-28°C) **4 часа ± 30 минут.**
5. Используя автоматическую технику промывки планшета, удалите содержимое всех ячеек, промойте по 0,35 мл/лунку рабочего Промывочного раствора, приготовленного из ELISA Реагента А, пять раз.
6. Добавьте **150 мкл ELISA Реагент В** (раствор ТМБ) в каждую лунку.
7. Закройте планшет алюминиевой фольгой. Инкубируйте ячейки **на шейкере** при 170±10 об/мин при комнатной температуре (22-28°C) в течение **30±5 минут.**
8. Добавьте **100 мкл** стоп реагента в каждую лунку, используя полуавтоматический диспенсер. Осторожно перемешайте.
9. Измерьте оптическую плотность раствора в течение 10 минут в ячейках при **450 нм** на ридере, используя в качестве Бланка 250 мкл дистиллированной воды. Считайте оптическую плотность

повторно при 405 нм против дистиллированной воды.

Замечание: повторное считывание при 405 нм предназначено, чтобы улучшить аналитическую точность калибровочной кривой в диапазоне значений самого высокого калибратора, (это приблизительно 500 пг/мл). Поэтому образцы с концентрацией АКТГ > 150 пг/мл и до значения наивысшего стандарта должны быть проанализированы при 405 нм, и их концентрация рассчитывается по калибровочной кривой, построенной по стандартам, считанным при 405 нм, для того, чтобы избежать измерения близко от длины волны максимума абсорбции. Образцы с концентрацией до 150 пг/мл, измеряются при 450 нм. Таким образом, будет достигнута максимальная чувствительность метода.

- Для построения калибровочной кривой и расчёта концентрации АКТГ используйте аппроксимацию кубическими сплайнами, 4-х параметрическую интерполяцию или интерполяцию «точка за точкой».

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ РАБОТЫ

- АКТГ 1-39 очень неустойчивая молекула. Проводите анализ немедленно после растворения лиофилизированных стандартов или после размораживания их, контролей, образцов пациентов.
- Рекомендуется все калибраторы, контроли и образцы анализировались в дубликаты. Средняя абсорбция дубликатов затем используется для редукции данных и вычисления результатов.
- Избегайте пузырьков воздуха при пипетировании, используя реверсивное пипетирование, следуя инструкциям изготовителя.
- Все образцы со значениями, большими, чем у самого высокого стандарта, приблизительно 500 пг/мл, должны быть разбавлены нулевым калибратором (0 пг/мл) и проанализированы еще раз. Если требуется, умножьте полученное значение концентрации АКТГ на фактор разбавления.
- Не меняйте реагенты разных серий.
- В качестве альтернативы, можно смешать Реагенты 1 и 2 в равном соотношении и вносить в ячейки смешанный Реагент по 50 мкл в каждую ячейку. Это заменяет шаги 3 и 4, после чего следует процедура инкубации.
- При смешивании избегайте выплескивания реагентов из ячеек. Это влияет на точность анализа.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ручной метод

- Для считывания при 450 нм, постройте кривую, используя первых пять калибраторов, напр. А, В, С, D и Е. При 405 нм считывании постройте вторую кривую, используя три калибратора с наивысшими концентрациями, напр. Калибраторы D, Е и F.
- Пометьте концентрации для каждого калибратора, указанные на флаконах в пг/мл. Пометьте данные из калибровочной кривой на линейной графической бумаге с концентрацией на оси X и соответствующие А.У. на оси Y.
- Нарисуйте прямые линии между 2 смежными точками. Этот математический алгоритм широко известен как вычисление «от точки к точке». Вычислите концентрацию образцов, используя полученные абсорбции на оси Y. Образцы пациентов и контроли необходимо считывать при 450 нм для АКТГ концентрации до 150 пг/мл. АКТГ концентрация выше 150 пг/мл должны интерполироваться при 405 нм.

Автоматический метод

Следует использовать кубическую регрессию или 4 PL (параметровую логику) или от точки к точке.

Данные образцов при 450 нм (построенные считанная абсорбция против дистиллированной или деионизированной воды). Смотрите таблицу в оригинале инструкции на англ. языке на стр. 2).

*при концентрации выше 150 пг/мл, рекомендуется использовать данные полученные при 405 нм как показано в **Данных образцов при 405 нм** в таблице ниже. (см. в оригинале инструкции).

Для образцов при считывании результатов ниже 150 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 450 нм как указано в таблице выше. Это даст возможность получения данных с оптимальной чувствительностью.

Примечание: указанные данные только для иллюстрации и не должны использоваться для вычисления результатов.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольную сыворотку или плазму следует использовать в каждом анализе. Полученные результаты для контрольных образцов следует оценить соответствующим статистическим методом. Если контрольные образцы не попадают в установленные границы, результаты пациентов могут быть неверными.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Хук-эффект не наблюдается до 20,000 пг/мл АКТГ. Образцы с высшим уровнем АКТГ чем наивысший калибратор, должны быть разбавлены и протестированы повторно.

АКТГ результаты должны интерпретироваться осторожно в соответствии с клинической картиной.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровни АКТГ были измерены в 134 очевидно здоровых индивидов. Полученные значения были в диапазоне 7,0 – 63 пг/мл. Результаты показаны на рис. в оригинале инструкции на англ. языке на стр. 8. Среднее геометрическое \pm 2 стандартных отклонения среднего были вычислены как 6.17-58.2 пг/мл.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Точность

300 образцов пациентов с значениями АКТГ 1,0 – 640 пг/мл были проанализированы предыдущей версией и данным обновленным тестом. Анализ линейной регрессии показал следующие результаты:
Biomerica ELISA=1.02 - 1.58 пг/мл
r=0,995 N=300

Чувствительность

Чувствительность или минимальный определяемый уровень составляет 0,22 пг/мл.

Точность и восстановление

Внутри тестовая точность была вычислена, основываясь на 25 определениях каждого из двух образцов.

Внутри тестовая вариация

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

Общая точность (межтестовая точность) была вычислена для данных двух образцов, полученных в 21 разном анализе реагентов трех разных лотов, за период 4 недели.

Межтестовая вариация

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

Специфичность и перекрестная реактивность

Перекрестная реактивность АКТГ была определена добавлением разных материалов к АКТГ стандарту. Были получены следующие результаты (казаны в таблице в оригинале инструкции на англ. языке на стр. 3).

Восстановление

Разное количество АКТГ было добавлено к четырем разным образцам плазмы пациента для определения восстановления. Результаты показаны в оригинале инструкции на англ. языке на стр. 3.

Кинетический эффект анализа

Для определения есть ли систематический кинетический эффект между началом анализа и концом анализа, три пробы пациента, выбранные для представления перекрестной секции АКТГ концентрации, был использован в анализе для одного микропланшета (12 8-ячеековых стрипов).

Линейность разбавления образца пациента: параллелизм

Пять образцов плазмы пациента были разбавлены калибратором А (нулевым калибратором). Результаты в пг/мл показаны в таблице на стр. 4.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com