

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНУ МЕТОДОМ ІФА

Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) Test System

Кат. №: 10625-300A

Дата випуску інструкції: 30-03-2022

Версія: 1



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: Кількісне визначення концентрації адренокортикопного гормону в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

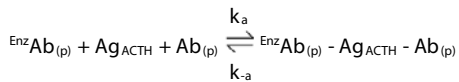
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод рівноваги типу сендвіч (тип 2):

Імунологічний тест АКТГ - це адаптований двосайтовий ІФА типу сендвіч. У цьому аналізі стандарти та зразки пацієнтів одночасно інкубують з міченим ферментом антитілом виявлення та антитілом захоплення, нанесеним на мікропланшеті. По закінченні інкубаційного кроку аналізу лунку для мікропланшетів промивають для видалення незв'язаних компонентів, а фермент, зв'язаний з твердою фазою, інкубують із субстратом - тетраметилбензидином (ТМБ). Потім для зупинки реакції додають кислий стоп-розчин, який перетворює колір у жовтий. Інтенсивність жовтого кольору прямо пропорційна концентрації АКТГ у зразку. Стандарти використовуються для формування кривої реакції на дозу одиниці поглинання в порівнянні з концентрацією. Концентрації АКТГ, присутні в контролі та зразках пацієнтів, визначаються безпосередньо з цієї кривої.

Основні реактиви, необхідні для аналізу рівноваги типу сендвіч, включають антитіла з високою спорідненістю та специфічністю (передача сигналу та захоплення) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі калібратор, контроль або зразок пацієнта додають у лунки, покриті антитілами до АКТГ. АКТГ із зразка зв'язується з анти-АКТГ (PoAb) у лунках. Згодом у лунки додають фермент, мічений анти-АКТГ. АКТГ із зразка утворює сендвіч між двома антитілами. Надлишок ферменту та зразка видаляється за допомогою етапу промивання. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab(p) = Анти-АКТГ (PoAb) (На лунках в надлишку)

AgACTH = Нативний антиген (Змінна кількість)

EnzAb(p) = Фермент мічений мишачим α АКТН(P) (Надмірна кількість)

EnzAb(p) - AgACTH - Ab(p) = Сендвіч-комплекс Антиген-Антитіло

k_a = Постійна швидкості асоціації

k_{-a} = Постійна швидкість дисоціації

Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, прямо пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних еталонів в сироватці відомих значень антигену, може бути сформована крива реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію антигену невідомого.

У лунки додають відповідний субстрат для отримання кольору різної інтенсивності залежно від концентрації АКТГ у лунках. Інтенсивність кольору у зразку можна візуально порівняти з відомими калібраторами для отримання якісних результатів або розвиток кольору можна прочитати за допомогою мікропланшетного спектрофотометра для отримання напівкількісних результатів.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

- A. Калібратори АКТГ (сушені) - 1.0 мл (мл)/флакон**
Шість (6) флаконів референсного матеріалу для АКТГ у приблизному діапазоні концентрацій 0, 20, 100, 250, 750 та 2000 пг/мл (pg/ml). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). **Розвести кожен флакон з 1 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Відновлені калібратори стабільні протягом 1 години при 2-8 °C (°C). Додано консервант. Протягом більш тривалих періодів після відновлення, аликвотуйте на менші порції та заморожуйте (<-20 °C (°C)) до 3 місяців. Цикли заморожування та розморожування слід мінімізувати до одного разу.
- B. Контроль М АКТГ (сушений) - 1.0 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон контролю АКТГ, що містить ліофілізовану сироватку. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). **Розчинити з 1 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Відновлений контроль слід аналізувати негайно після відновлення. Додано консервант. Протягом більш тривалих періодів після відновлення, аликвотуйте на менші порції та заморожуйте (<-20 °C (°C)) до 3 місяців. Цикли заморожування та розморожування слід мінімізувати до одного разу.
- C. Ферментний реагент АКТГ - 6 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон містить антитіло, кон'юговане з АКТГ-HRP (пероксидаза хрому), у буфері на основі білка та нертутий консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- D. Пластина, покрита антитілами до АКТГ - 96 лунок**
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антитілом до АКТГ, упакований в алюмінієвий пакет з сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- E. Концентрат промивного розчину - 20 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить ПАУ в забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- F. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить у буфері тетраметилбензидин (ТМБ) та пероксид водню (H₂O₂). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5 M (M) H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- H. Інструкція**

Зауваження 1: Не використовуйте реактиви після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. **Відкриті реактиви стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору та компонента вказана на етикетці.**

Зауваження 3: Всі реактиви призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єм 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)), 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 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in-vitro

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Всі продукти, що містять сироватку, 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. Хороші лабораторні процедури поводження з продуктами крові можна знайти в Центрі контролю захворювань/Національному інституті здоров'я, «Біологічна безпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях», 2-е видання, 1988 р., публікація NHS № (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками має бути сироватка крові за типом або гепаринізована 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 у звичайну пробірку для венепункції, що не містить добавок та антикоагулянтів для сироватки; використовувати вакуумну пробірку(и), що містить гепарин для плазми. Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C (°C) протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу в двох примірниках потрібно 0.10 мл (мл) (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 контроли 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

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (мл) дистильованою або деіонізованою водою у контейнері, зручному для зберігання. Розведений буфер зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контроли повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

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

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного калібратора, 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 0.50 мл (мл) (50 мкл (μl)) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) ферментного реагенту АКТГ у всі лунки. **Дуже важливо розподілити всі реагенти поблизу дна лунки з покриттям.**
- Акуратно повертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати (500-600 об/хв (rpm)), і обережно накрийте (див. Примітку 3).
- Інкубуйте 60 хвилин (1 годину) при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 0.350 мл (мл) 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 під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 0.100 мл (мл) 100 мкл (μl) 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 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Додайте в кожен лунку 0.50 мл (мл) 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.**
- Зчитайте абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (nm) (використовуючи еталонну довжину хвилі 630 нм (nm), щоб мінімізувати дефекти лунки) у мікропланшетному зчитувачі. **Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.**

Примітка 1: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 2000 пг/мл (pg/ml) слід проводити розведення.

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

Примітка 3: Цикл (пуск і зупинка) змішування (4 цикли) протягом 5-8 секунд/цикл є більш ефективним, ніж один безперервний (20-30 секунд) цикл для досягнення однорідності. Для виконання циклів змішування можна використовувати планшетний змішувач.

Примітка 4: Надзвичайно важливо точно розподілити правильний об'єм за допомогою каліброваної піпетки та додаючи біля нижньої частини мікролунки під кутом, торкаючись бічної частини лунки.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації АКТГ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

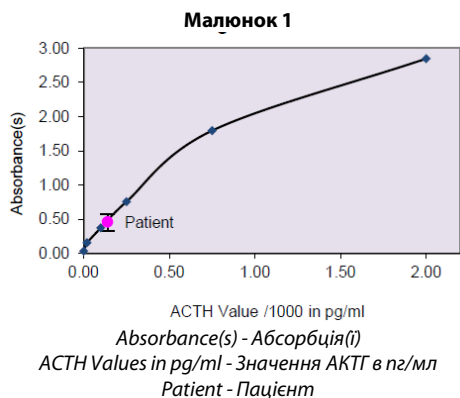
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення поглинання для референсної сироватки в дубляж відповідно до концентрації АКТГ в пг/мл (pg/ml) на лінійному міліметровому папері (перед тим, як складати графік, не слід усереднювати дублікати референсної сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію АКТГ для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у пг/мл (pg/ml)) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено).

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

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і не повинні використовуватися для розрахунку результату.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (пг/мл (pg/ml))
Калібратор А	A1	0.038	0.033	0
	B1	0.028		
Калібратор В	C1	0.155	0.154	20
	D1	0.152		
Калібратор С	E1	0.370	0.374	100
	F1	0.378		
Калібратор D	G1	0.761	0.758	250
	H1	0.756		
Калібратор Е	A2	1.796	1.797	750
	B2	1.797		
Калібратор F	C2	2.879	2.850	2000
	D2	2.821		
Пацієнт 1	G2	0.459	0.458	140.0
	H2	0.457		



*Якщо показник поглинання не відповідає шкалі або перевищує середнє поглинання найвищого калібратора, аналіз зразка слід повторити з розведенням.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Поглинання (OD) калібратора «F» (2000 пг/мл (pg/ml)) має бути ≥ 1.3 .
2. 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

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погане промивання лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. 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.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. 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.
12. Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур тестової системи 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.

4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. 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.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Набір АКТГ AccuBind® ІФА не демонструє хук-ефекту високих доз із зразками з додаванням 2 000 000 пг/мл (pg/ml) інтактного АКТГ. Проте зразки з інтактним рівнем АКТГ, що перевищує найвищий калібратор, слід розбавляти та повторно аналізувати для отримання правильних значень.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рівні АКТГ вимірювали у трьохсот п'ятдесяти чотирьох (354), очевидно, нормальних людей. Отримані значення становили від 7.2 до 63.3 пг/мл (pg/ml).

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, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити власний діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність вимірювання тестової системи АКТГ AccuBind® ІФА в аналізі і між ними була визначена шляхом аналізу на трьох різних рівнях контрольних пулованих сироваток та на трьох рівнях сироватки пацієнтів. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

	Середнє значення (пг/мл (pg/ml))	Точність в аналізі		Загальна точність (n = 80)	
		SD	CV%	SD	CV%
Контроль 1	36.06	3.23	8.95	2.81	7.8
Контроль 2	191.28	3.08	1.61	14.56	7.61
Контроль 3	90.23	2.25	2.5	5.41	6
Пацієнт 1	1181.18	33.31	2.82	109.64	9.28
Пацієнт 2	22.59	1.25	5.51	1.21	5.37
Пацієнт 3	292.36	5.95	2.04	26.28	8.99

14.2 Чутливість

Тестова система АКТГ AccuBind® ІФА має LoB 2.81 пг/мл (pg/ml) і LoD/LoQ 3.13 пг/мл (pg/ml).

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність тестової системи АКТГ AccuBind® ІФА була перевірена шляхом розведення зразків сироватки крові людини, що містять високий рівень АКТГ (~ 2300 пг/мл (pg/ml)), з сироватковим референсним матеріалом «0 пг/мл (pg/ml)». Було визначено, що система має чудову лінійність до 2300 пг/мл (pg/ml) зі зменшенням 1.005 та коефіцієнтом кореляції 0.994. Очікувані значення порівнювали із спостережуваними концентраціями зразків та зобразили на малюнку 2.

