

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГОРМОНУ РОСТУ (hGH)

1725-300, Growth Hormone (hGH) Test System

Каталог. №: 1725-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 06-07-2012

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. ПРИЗНАЧЕННЯ

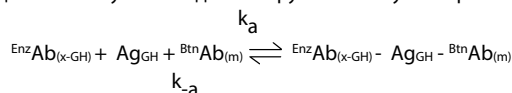
Тест призначений для кількісного визначення концентрацій Гормону росту hGH в людській сироватці.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до hGH. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген hGH, між hGH антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{GH} = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(m)}$ = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(x-GH)} - \text{Ag}_{GH} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

$\text{EnzAb}_{(x-GH)} - \text{Ag}_{GH} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{Стрептавідин}_{\text{c.w.}} \Rightarrow \text{іммобілізований комплекс}$,

Стрептавідин_{c.w.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантациєю або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

А. Калібратори hGH – 1.0 мл/флакон

6 флаконів референсної сироватки (стандартів) з концентраціями hGH 0 (A), 2 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) і 150 (F) мкМОд/мл. Зберігати при 2-8 °С. В зразки додані консерванти.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки відкалібровані по Міжнародному стандарту WHO 2nd IS # 98/574.

В. Ферментний реагент hGH – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені афінно очищені IgG-антитіла проти hGH і біотинильовані моноклональні мишачі IgG-антитіла проти hGH в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

С. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

Д. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

Е. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

Ф. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

Г. Стоп-розчин – 8.0 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

Н. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV 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.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю, відповідні гіпо-, гіпер і еутиреоїдному діапазонам для відстеження характеристик набору. Ці контролю 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. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

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

2. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
- Додайте піпеткою по 50 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту hGH у кожен лунку.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл 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 гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату 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 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл 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 (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації hGH в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації hGH в мкМОд/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації hGH в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.672 перетинає стандартну криву при 20.5 мкМОд/мл (див. мал. 1)

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (мкМОд/мл)
Калібратор А	A1	0.010	0.010	0
	B1	0.009		
Калібратор В	C1	0.098	0.095	2.0

	D1	0.092		
Калібратор С	E1	0.378	0.384	10.0
	F1	0.390		
Калібратор D	G1	0.818	0.791	25.0
	H1	0.764		
Калібратор E	A2	1.358	1.332	50.0
	B2	1.306		
Калібратор F	C2	2.412	2.372	150.0
	D2	2.322		
Контроль 1	E2	0.486	0.494	13.3
	F2	0.502		
Контроль 2	G2	1.412	1.404	61.0
	H2	1.396		
Зразок	A3	0.678	0.672	20.5
	B3	0.666		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1 (Див. оригінал інструкції).

11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність калібатора F ≥ 1.3 .
- Оптична щільність калібатора A ≤ 0.1 .
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

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.
- Даний метод був розроблений таким чином, щоб уникнути Хук-ефекту в зразках з високими концентраціями. Зразки з концентрацією вище 150 мкМОд/мл мають бути розведені і протестовані ще раз.
- У пацієнтів, які отримують замісну терапію hGH, можуть розвиватися антитіла до hGH, які можуть впливати на результати аналізу і бути причиною помилкових низьких результатів. Генетичні варіанти або деградація можуть змінювати характеристики зв'язування антитіл і, відповідно, впливати на результати аналізу. Такі зразки можуть давати результати, що не узгоджуються з результатами інших методів, що використовують інші антитіла, що розпізнають інші епітопи.
- 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 для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- 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 розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Дуже рідко були отримані значення понад 150 мкМОд/мл. Нормальні значення повинні становити 60 мкМОд/мл або нижчі. 75 здорових пацієнтів були тестовані за допомогою даного методу. Результати наведені в таблиці 1:

Таблиця 1
Очікувані значення в мкМОд/мл

	N	Середнє значення	Діапазон
Зразки	75	9.1	0 - 55

Важливо пам'ятати, 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 встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору hGH всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкМОд/мл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	24	10.38	0.33	3.13
Рівень 2	24	26.23	1.17	4.45
Рівень 3	24	61.80	3.40	5.50

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мкМОд/мл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	39	10.48	0.48	4.58
Рівень 2	39	26.08	1.77	6.78
Рівень 3	39	64.61	4.56	7.09

*вимірювання проводились в експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість (межа визначення) визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту 0 мкМОд/мл плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі. Чутливість методу склала 0.005 мкМОд/мл.

14.3 Точність

Справжній метод AccuBind™ hGH Elisa порівнювали з референсним імунорадіометричним методом. Використовувалися зразки сироваток (n = 80) симптоматичної та безсимптомної популяції. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	15.2	Y = 0.091 + 0.98 (x)	0.985
Метод порівняння	15.4		

Була визначена тільки незначна розбіжність даного методу та референс-методу, що доводить близькість середніх значень. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресна реактивність даного методу визначення hGH з вибраними речовинами вивчали додаванням впливаючих речовин до сироватці в різних

концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози впливаючої речовини до дози hGH, необхідного для одержання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність
Гормон росту (GH)	1.0000
Лютетінізуючий гормон (LH)	< 0.0001
Фолікулостимулюючий гормон (FSH)	< 0.0001
Хоріонічний гонадотропін (CG)	< 0.0001
Тиреоїдний стимулюючий гормон (TSH)	< 0.0001
Пролактин гормон (PRL)	< 0.0001



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

