

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА (HGH)

EIA-1787, HGH (Human Growth Hormone)

Каталог. № : EIA-1787
Количество : 96
Производитель: DRG, (США)

Методика от 11-02-2013
Версия 6.0



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

Только для диагностического использования in vitro

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения концентрации человеческого гормона роста в сыворотке. Анализ полезен в диагностике и лечении расстройств, связанных с аденогипофизом.

ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественный тест HGH базируется на принципе ИФА (реакция ферментосвязанной иммуносорбции на солидной фазе). Система использует анти-HGH антитела овцы для иммобилизации в твердой фазе (микротитрационные лунки) и мышинные моноклональные анти-HGH антитела в растворе конъюгата антитело-фермент (пероксидаза). Тестируемый образец одновременно реагирует с антителами, что приводит к освобождению молекул HGH, которые находятся между солидной фазой и ферментосвязанными антителами.

После 45-минутной инкубации при комнатной температуре лунки с целью удаления несвязанных антител промываются водой. Добавляется реагент ТМВ и инкубируется еще 20 минут, что дает образование голубого цвета, которое останавливается добавлением Стоп Раствора, после чего образуется желтый цвет и производится измерение на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Концентрация HGH прямо пропорциональна интенсивности цвета исследуемого образца.

РЕАГЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора:

1. Планшет с лунками, покрытыми анти-HGH антителами овцы, 96 лунок.
2. Реагент ферментного конъюгата, 13 мл. Содержит моноклональное мышинное анти-HGH, конъюгированное пероксидазой хрена.
3. Набор референтных стандартов, включающих 0; 2.5; 5; 10; 25 и 50 нг/мл HGH, готовые к использованию.
4. Реагент ТМВ, 1 бутылка, 11 мл. Содержит 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидина, стабилизированного в растворе буфера.
5. Стоп-раствор (1N HCl), 1 бут., 11 мл. Содержит разбавленную хлористоводородную кислоту.

Необходимые, но не поставляемые материалы:

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Точные пипетки: 0.05, 1.0, 0.2 и 1.0 мл.
- Сменные наконечники для пипеток.
- Микротитрационный луночный ридер для считывания абсорбции при 450 нм.
- Промокательная бумага.
- Бумага для построения графиков.
- Вortexный смеситель или аналог.
- Материалы контроля качества (напр. контрольная сыворотка Biorad Lyphocheck).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Внимание: данный набор содержит материал человеческого происхождения. Исходный материал, используемый для изготовления набора, был протестирован утвержденными методами FDA и дал отрицательный результат на HBsAg, ВИЧ 1 и 2 и HCV. Однако, ни один метод не может полностью гарантировать отсутствие этих возбудителей. Поэтому все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально инфекционными. Использование и утилизация данных материалов должны

проводиться в соответствии с национальными методическими указаниями относительно безопасности использования биологически опасных веществ.

2. Не используйте реагенты после истечения срока годности; не меняйте компоненты набора, не используйте компоненты наборов разных партий.
3. Не используйте реагент, если он помутнел, или у Вас есть подозрение его заражения.
4. Не используйте реагент, если флакон поврежден.
5. Сразу же закручивайте колпачки флаконов. Не меняйте колпачки.
6. Каждая лунка может использоваться только один раз.
7. Не распределяйте реагенты ртом.
8. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид натрия, не должны использоваться в ферментной реакции.
9. Избегайте контакта с 1N HCl. Он может вызвать раздражение кожи и ожоги. В случае контакта промойте большим количеством воды и обратитесь к доктору, если раздражение не проходит.
10. Только для диагностического использования in vitro.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. После получения неоткрытые наборы хранить при 2-8 °C до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
2. Открытые используемые реагенты стабильны до истечения срока годности в условиях правильного хранения при темп. 2-8 °C.
3. Храните микропланшет в запечатанной упаковке с дессикантом, чтобы минимизировать подвергание его внешнему воздействию и попадание влаги.

ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Для измерения абсорбции можно использовать микротитровальный луночный считыватель с диапазоном частот 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности от 0 до 2 ОП или больше при длине волны 450 нм

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Сыворотка должна быть приготовлена из цельной крови, собранной обычной технологией. Этот набор предназначен для использования сыворотки без добавок. Избегайте высокогемолитических (ярко-красных), липемических (белесоватых) и мутных образцов.
2. Образцы нужно закрывать колпачком и можно хранить до 48 часов при температуре 2-8 °C. Образцы, хранящиеся на протяжении более длительного времени (до 6 месяцев), нужно замораживать до температуры -20 °C, но только 1 раз. Перед проведением анализа размороженные образцы следует несколько раз перевернуть.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием довести реагенты до комнатной температуры (18-25 °C) и перемешать путем осторожного переворачивания или покачивания. Не вызывать пенообразования.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Ручное раскапывание:
Для каждого анализа рекомендуется использовать не более 32 лунок. Раскапывание всех стандартов, образцов и контролей необходимо завершить в пределах 3 минут. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку.
2. Автоматическое раскапывание:
В каждом анализе можно использовать полный планшет с 96 лунками. Однако рекомендуется завершить раскапывание всех стандартов, образцов и контролей в пределах 3 минут.
3. Тестирование всех стандартов, образцов и контролей нужно проводить параллельно в двойном экземпляре с одинаковыми условиями анализа.
4. Рекомендуется считать лунки в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите в держателе нужное количество покрытых антителами лунок.
2. Внесите по **50 мкл** стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите по **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешивайте в течении **30 секунд**.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (18-25 °C) в течении **45 мин**.
6. Удалите содержимое лунок, перевернув содержимое планшета в контейнер для отходов.

- Опустошите планшетку и промойте 5 раз дистиллированной или деионизированной водой (не используйте воду из-под крана).
- Перевернуть планшет и резко стукнуть им об лист промокательной бумаги или бумажного полотенца для удаления остатков воды.
- Внесите **100 мкл** раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
- Инкубируйте при комнатной температуре в темном месте в течении **20 минут**.
- Остановите реакцию внесением **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
- Аккуратно перемешивайте на протяжении **30 секунд. Очень важно убедиться, что весь голубой окрас стал желтым.**
- Используя ридер для планшетов, измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм на протяжении **15 мин.**

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Расчитать средние значения поглощения (A_{450}) из двойных наборов каждого стандарта, контрольных сывороток и образцов.
- На бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в нг/мл на горизонтальной оси (X).
- С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию HGH в нг/мл. В зависимости от опыта и наличия необходимой техники, можно применять другие методы обработки данных.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Референтные стандарты стандартизированы по эталону 1 IRP, 66/217 Всемирной организации Здравоохранения.

ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типического анализа со считыванием ОП при 450 нм. Следующие данные предназначены только для демонстрации и не должны использоваться во время тестирования.

HGH (нг/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0,052
2,5	0,392
5	0,641
10	1,125
25	1,946
50	2,610

Пример калибровочной кривой смотрите в оригинале инструкции

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Каждая лаборатория должна установить свои собственные границы значений, базируемые на популяции пациентов. Нормальные границы концентрации HGH тяжело определить в связи с физиологическими ее колебаниями. У большинства взрослых в покое, после ночного сна HGH-уровень в сыворотке приближается к 7 нг/мл. Колебания его концентрации в ответ на различные стимулы дает более точное представление о питуитарной дисфункции.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартные правила лабораторной практики требуют, чтобы контроль использовался при каждой калибровочной кривой. Статистически значительное количество контролей должно быть измерено, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, гарантирующие точную работу.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Достоверность

Статистическое исследование, проведенное среди образцов здоровых пациентов, продемонстрировало хорошую корреляцию с имеющимся на рынке набором, приведенную ниже:

- Сравнение между наборами DRG и DPC показало следующие результаты:

N = 134
 Коэффициент корреляции = 0,962
 Уклон: 1,041
 Точка пересечения: 0,115
 Среднее значение DRG: 1,780 нг/мл
 Среднее значение Bio-Rad: 1,970 нг/мл

- Сравнение между наборами DRG и Nichols Institute показало следующие результаты:
- N = 134

Коэффициент корреляции = 0,985
 Уклон: 0,860
 Точка пересечения: 0,119
 Среднее значение DRG: 1,780 нг/мл
 Среднее значение Bio-Rad: 1,650 нг/мл

В. Чувствительность

Минимальная концентрация, определяемая данным набором, составляет 0,5 нг/мл.

С. Точность

а. Точность в пределах анализа
 Точность в пределах анализа определялась повторным определением трех разных образцов сыворотки в одном анализе. Изменчивость в пределах анализа показана ниже:

Образец сыворотки	1	2	3
Количество повторов	28	28	28
Среднее IgE (нг/мл)	6,93	12,92	31,17
Стандартное отклонение	0,20	0,32	0,67
Коэффициент изменчивости %	2,9%	2,5%	2,2%

б. Точность между анализами
 Точность между анализами определялась повторным измерением трех разных образцов сыворотки в нескольких индивидуально калиброванных анализах. Изменчивость между анализами показана ниже:

Образец сыворотки	1	2	3
Количество повторов	28	28	28
Среднее IgE (нг/мл)	6,55	11,90	30,85
Стандартное отклонение	0,21	0,52	0,91
Коэффициент изменчивости %	3,2%	4,4%	3,0%

Д. Исследование выявления вещества и линейности

а. Выявление

Смешали и проанализировали в двойном экземпляре разные сыворотки пациентов известных уровней HGH. Среднее выявление составляет 95,8%.

	Ожидаемая Концентрация (нг/мл)	Наблюдаемая концентрация (нг/мл)	% выявления
1	2,10	2,13	101,4%
	3,17	2,88	90,9%
	3,44	3,51	102,0%
	0,97	10,5	108,2%
	1,57	1,50	95,5%
Среднее выявление =			99,6%
2	3,70	3,16	85,4%
	9,02	8,38	92,9%
	3,74	5,59	96,0%
	4,94	4,41	89,3%
Среднее выявление =			90,9%

б. Линейность

Два образца пациентов были последовательно разбавлены нулевым стандартом для определения линейности. Среднее выявление составляет 105,1%.

Таблицу линейности см. в оригинале инструкции.

Е. Специфичность

Для определения перекрестной реакции проанализировали следующие вещества:

Анализируемый гормон	Концентрация	Интенсивность, равная HGH (нг/мл)
HCG (1й IRP WHO 75/537)	100 мМЕ/мл	0
	62,000 мМЕ/мл	0
	500,000 мМЕ/мл	0
TSH (2й IRP WHO 80/558)	125 мкМЕ/мл	0
	250 мкМЕ/мл	0
	500 мкМЕ/мл	0
LH (1й IRP WHO 68/40)	125 мМЕ/мл	0
	250 мМЕ/мл	0
	500 мМЕ/мл	0
FSH (2й IRP HMG WHO)	125 мМЕ/мл	0
	250 мМЕ/мл	0
	500 мМЕ/мл	0
Пролактин (1й IRP WHO 75/504)	50 нг/мл	0
	100 нг/мл	0
	500 нг/мл	0,5

Ф. «Хук»-эффект

В данном анализе «хук»-эффект не наблюдается при концентрации HGH до 1,000 нг/мл.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Верные и воспроизводимые результаты можно получить, когда процедура теста проводится с полным пониманием сути инструкции и при хорошей лабораторной практике.
2. Результаты полученные от использования настоящего набора должны использоваться в качестве дополнения к другим диагностическим процедурам и информации, располагаемой врачом.
3. Очень важной является процедура промывания. Недостаточное промывание дает неточные результаты и ложно завышенную абсорбцию.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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