

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АЛЬДОСТЕРОНУ

10125-300, Aldosterone Test System

Каталог. №: 10125-300

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Кількість : 96

Версія 1

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

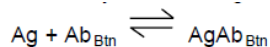
Призначення використання: Кількісне визначення концентрації альдостерону в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний з затримкою імуноферментний аналіз (ТИП 9):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіло, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген. При змішуванні біотинильованого антитіла із сироваткою, що містить антиген, виникає реакція між антигеном та антитілом. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:

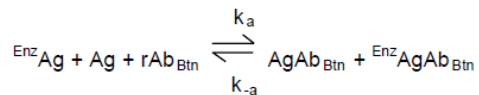


Ab_{Btn} = Біотинильоване антитіло

Ag = Антиген (Змінна кількість)

$AgAb_{Btn}$ = Імунний комплекс

Після короткої інкубації додають ферментний кон'югат. (Це відстрочене додавання дозволяє збільшити чутливість для зразків з низькою концентрацією). Після додавання ферментного кон'югату відбувається реакція конкуренції між аналогом ферменту та антигеном у зразку за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл (не використаних у першій інкубації).



$EnzAg$ = Кон'югат Фермент-антиген (постійна величина)

$EnzAgAb_{Btn}$ = Комплекс Кон'югат Фермент-антиген - Антитіло

rAb_{Btn} = Біотинильоване антитіло, що не зреагувало в першій інкубації

k_a = Постійна швидкості асоціації

k_{-a} = Постійна швидкість дисоціації

$K = k_a / k_{-a}$ = Постійна рівноваги

Виникає одночасна реакція між біотином, прикріпленим до антитіла, та стрептавідином, іммобілізованим у мікролунці. Це впливає на поділ фракції, пов'язаної з антитілами, після декантації або аспірації.

$AgAb_{Btn} + EnzAgAb_{Btn} + Streptavidin_{CW} \Rightarrow$ іммобілізований комплекс

$Streptavidin_{CW}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунці

Immobilized complex = сендвіч-комплекс, прив'язаний до твердої поверхні

Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних референсних матеріалів сироватки відомих концентрацій антигену, можна сформулювати криву реакції на дозу, з якої можна встановити невідому концентрацію антигену.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори альдостерону - 1 мл/флакон (ліофілізований)

Шість (6) флаконів сироваткового референсного матеріалу альдостерону в концентраціях 0 (A), 25 (B), 125 (C), 250 (D), 500 (E), 1500 (F) у нг/мл. Зберігати при температурі 2-8 °C. Розвести кожен флакон з 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні протягом 30 днів при температурі 2-8 °C. Додано консервант. Концентрації можна виразити в нг/дл, поділивши на 10.

B. Контроль альдостерону - 1 мл/флакон (ліофілізований)

Один (1) флакон матриці на основі сироватки людини, що містить альдостерон у встановлених межах. Зберігати при температурі 2-8 °C. Розвести кожен флакон з 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води. Відновлений контроль стабільний протягом 30 днів при 2-8 °C. Додано консервант.

C. Ферментний реагент альдостерону - 7.0 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить кон'югат альдостерон (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) у білок-стабілізуючій матриці з барвником. Зберігати при температурі 2-8 °C.

D. Біотиновий реагент альдостерону - 7.0 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить біотинильований кон'югат анти-альдостерон IgG у буфері, барвник та консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

E. Пластина зі Стрептавідиновим покриттям - 96 лунок

Один мікропланшет із 96 лунками, покритий стрептавідином, упакований в алюмінієвий пакет із сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

F. Концентрат промивного розчину - 20 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить ПАР у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

G. Субстратний реагент - 12 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить у буфері тетраметилбензидин (ТМВ) та пероксид водню (H₂O₂). Зберігати при температурі 2-8 °C.

H. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5 M H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-8 °C.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

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

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Піпетка здатна подавати обсяги 0.025 мл (25 мкл) та 0.050 мл (50 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.050 мл (50 мкл), 0.100 мл (100 мкл) та 0.350 мл (350 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Дозатор регульованого об'єму від 0.050 до 1.0 мл (50 мкл-1000 мкл) для кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
9. Таймер.
10. 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, 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, HHS.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками має бути кров, сироватка або гепаринізована плазма за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при зборі зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати у пробірки з червоною кришкою (з добавками гелю або без них) для венепункції або для плазми використовуйте вакуумну пробірку, що містить гепарин. Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано протягом ночі для забезпечення зразка натще.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу в двох примірниках потрібно 0.050 мл (50 мкл) 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 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.

8.0 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.

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

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C.
- Внесіть по 0.025 мл (25 мкл) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) біотинового реагенту альдостерону у всі лунки.
- Акуратно перевертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати.
- Накрийте кришкою та інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) ферментного реагенту Альдостерону в кожну лунку.

Додайте безпосередньо поверх реагентів, що подаються в лунки.

- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Накрийте кришкою та інкубуйте протягом 45 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- 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 пляшка,

наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.

- Додайте по 100 мкл розчину субстрату в кожну 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.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну 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 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Розведіть зразки з підозрою на концентрацію вище 1500 пг/мл 1:5 та 1:10 калібратором альдостерону «0» пг/мл.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації альдостерону в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дубляж відповідно до концентрації альдостерону в пг/мл на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію альдостерону для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у пг/мл) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (1.215) перетинає криву реакції на дозу при концентрації альдостерону 195 пг/мл (див. Малюнок 1).

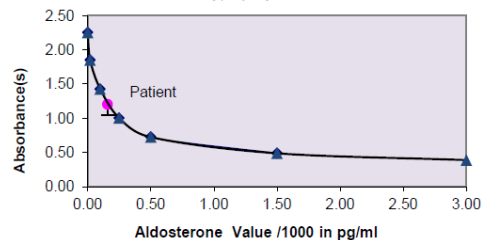
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ELISA, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (пг/мл)
Калібратор А	A1	2.611	2.611	0
	B1	2.599		
Калібратор В	C1	2.314	2.326	25
	D1	2.338		
Калібратор С	E1	1.529	1.533	125
	F1	1.536		
Калібратор D	G1	1.008	1.040	250
	H1	1.072		
Калібратор E	A2	0.583	0.584	500
	B2	0.585		
Калібратор F	C2	0.220	0.211	1500
	D2	0.203		
Пацієнт 1	G2	1.222	1.215	195
	H2	1.209		

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

Малюнок 1



Примітка: Помножьте горизонтальні значення на 1000, щоб перетворити на пг/мл.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна Оптична щільність (Калібратор 0 пг/мл) ≥ 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. Погана промивка 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 невірною.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених контрольних інтервалів для "нормальної" дорослої популяції очікувані діапазони для тестової системи альдостерону AccuBind® ELISA детально описані в таблиці 1.

Таблиця 1
Очікувані значення для тестової системи альдостерону

Вік	Поза невизначена	Лежачи на спині	Вертикально
0-6 днів	50-1020 пг/мл		
1-3 тижні	60-1790 пг/мл		
1-11 місяців	70-990 пг/мл		
1-2 роки	70-930 пг/мл		
3-10 років	40-440 пг/мл		
11-14 років	40-310 пг/мл		
15 років і старше	Менше або дорівнює 310 пг/мл	Менше або дорівнює 160 пг/мл	40-310 пг/мл

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 встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність вимірювання тестової системи Aldosterone AccuBind® ELISA в аналізі і між ними була визначена шляхом аналізу на шести різних рівнях контрольних пулованих сироваток. Кількість, середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2.

ТАБЛИЦЯ 2
Точні дані для тестової системи альдостерону

	Середнє значення (пг/мл)	Точність в аналізі		Загальна точність (n = 80)*	
		SD	CV%	SD	CV%
Зразок 1	42.54	3.07	7.22	4.52	10.62
Зразок 2	125.47	4.74	3.78	13.44	10.71
Зразок 3	246.77	15.34	6.21	26.01	10.54
Зразок 4	501.77	14.28	2.85	42.58	8.49
Зразок 5	734.90	16.19	2.20	45.76	6.23
Зразок 6	1162.50	28.12	2.42	71.63	6.16

*Виміряно в сорока експериментах у двох примірниках протягом 20 днів.

14.2 Чутливість

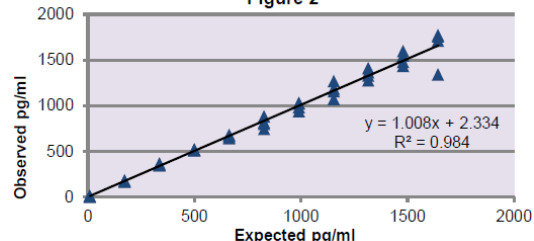
Тестова система Aldosterone AccuBind® ELISA має LoB 14.39 пг/мл і LoD 22.18 пг/мл.

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність тестової системи альдостерону AccuBind® ELISA була перевірена шляхом розведення зразків сироватки крові людини, що містять високий рівень альдостерону (~ 1700 пг/мл), з сироватковим референсним матеріалом "0 пг/мл". Було визначено, що система має чудову лінійність до 1700 пг/мл з нахилом 1.008 та коефіцієнтом кореляції 0.984. Очікувані значення порівнювали із спостережуваними концентраціями зразків та зобразили на малюнку 2.

Малюнок 2
Figure 2



14.3.2 Відновлення

Відновлення тест-системи Альдостерон AccuBind® ELISA було розраховано для п'яти зразків пацієнтів із додаванням 100, 250, 550, 850 та 1250 пг/мл альдостерону. Було встановлено, що відновлення становлять 15% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.3.3 Порівняння методів

Тестова система Альдостерон AccuBind® ELISA була порівняна з іншим аналізом ELISA іншого виробника. Були використані біологічні зразки із популяцій із низьким, нормальним та відносно високим вмістом альдостерону. (Значення коливались від 5 пг/мл до 850 пг/мл). Загальна кількість таких зразків становила 63. Рівняння найменшої квадратної регресії та коефіцієнт кореляції були розраховані для даного ІФА альдостерону порівняно з еталонним методом.

Таблиця 3

Метод	Середнє (x)	Аналіз найменших квадратних регресій	Коефіцієнт кореляції
Цей метод (y)	207.6	$y = 0.703x + 6.354$	0.959
Референсний (x)	286.4		

Лише незначні зміщення між цим методом та референсним методом вказують на близькість середніх значень. Рівняння найменшої квадратичної регресії та коефіцієнт кореляції вказують на чудову узгодженість методу.

14.4 Перехресна реактивність

% Перехресної реактивності антитіла альдостерону до вибраних речовин оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою альдостерону, необхідною для витіснення тієї ж кількості міченого аналога.

Субстанція	% Перехресної реактивності
Кортизол	< 0.001
Кортизон	0.012
Кортикостерон	0.010
Прогестерон	< 0.001
ДГЕА сульфат	0.016
Естрадіол-17β	0.008
Естріол	0.008



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

