

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАТИРЕОЇДНОГО ГОРМОНУ ІНТАКТНОГО МЕТОДОМ ІФА

Parathyroid Hormone Intact (PTH) Test System

Кат. №: 9025-300A

Дата випуску інструкції: 30-03-2022
Версія: 4



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВВЕДЕННЯ

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

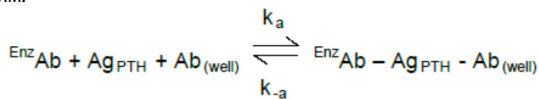
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод рівноваги типу сендвіч (ТИП 2):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої афінності та специфічності (ферментні та іммобілізовані) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні мікропланшетних лунок через взаємодію антитіла до х-ПТГ (С-кінцевий епітоп), нанесеного в лунці.

При змішуванні міченого ферментом антитіла (N-кінцевий епітоп) та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном та антитілами, без конкуренції та стеричних перешкод, з утворенням сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



де $\text{Ab}_{(\text{well})}$ = антитіла, нанесені в лунку (надлишкова кількість)

Ag_{PTH} = нативний антиген (змінна кількість)

Enz^{Ab} = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{Enz}^{\text{Ab}} - \text{Ag}_{\text{PTH}} - \text{Ab}_{(\text{well})}$ = сендвіч-комплекс антиген-антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Після необхідного інкубаційного періоду фракція зв'язаних антитіл відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції зв'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів сироватки з відомим значенням концентрації антигену будується крива доза-ефект, по якій обчислюється концентрація антигенів у невідомих зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори ПТГ - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізовані) - Піктограми A-F

Шість (6) флаконів референсного матеріалу для ПТГ з рівнями 0 (A), 15 (B), 75 (C), 150 (D), 500 (E) і 1000 (F) пг/мл (pg/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C).

Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Розведені калібратори стабільні протягом 24 годин при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аліквотувати відновлені калібратори у крио-флакони та зберігати при -20 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУВАТИ/РОЗМОРОЖУВАТИ БІЛЬШЕ ДВОХ РАЗІВ.** Містить консервант.

Примітка: Калібратори на основі людської сироватки простежуються за 1-м стандартом WHO 95/646.

B. Контролі ПТГ - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізовані) - Піктограми M&N
Два (2) флакони референсних контролів для ПТГ. Зберігати при 2-8 °C (°C). **Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Розведені контролі стабільні протягом 24 годин при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аліквотувати відновлені калібратори у крио-флакони та зберігати при -20 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУВАТИ/РОЗМОРОЖУВАТИ БІЛЬШЕ ДВОХ РАЗІВ.** Містить консервант.

C. Ферментний реагент ПТГ 2^{ої} Генерації - 6 мл (мл)/флакон - Піктограма «E»

Один (1) флакон містить реагент кон'югату анти-ПТГ. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Планшет з нанесеним антитілом ПТГ - 96 лунок - Піктограма «Y»
Один 96-луночковий мікропланшет, вкритий антитілом до х-ПТГ. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання (20X) - 20 мл (мл)/флакон - Піктограма «KRAPLIA»

Один (1) флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. Розділ Приготування реагенту.

F. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон - Піктограма «S^N»

Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон - Піктограма «STOP»

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

H. Інструкція

Примітка 1: Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності.

Примітка 2: Не піддавати реактиви впливу тепла, сонця або сильного світла.

Примітка 3: Всі реагенти призначені для формату одного 96-луночкового планшета. Інформація щодо інших конфігурацій набору міститься в таблиці в останній частині інструкції.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори, здатні вносити об'єми 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) та 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для багаторазових внесень об'ємом 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-дозатор (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. Матеріали для контролю якості.

5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in vitro

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

В ході застосування схвалених FDA реагентів всі продукти, що містять людську сироватку, продемонстрували 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 усіма продуктами людської сироватки слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, чи таким, що здатним переносити збудники хвороб, 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", 2-е видання, 1988, HHS Publication No/ (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками слугує сироватка крові або плазма ЕДТА за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при зборі зразків венепункцією. Для порівняння із нормальними значеннями повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в звичайну пробірку з червоним ковпачком для венепункції без добавок або

антикоагулянтів для сироватки або пробірки, що містять ЕДТА, для плазми. Дати крові згорнутися для зразків сироватки. Відцентрифугувати зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

Якщо зразок(и) неможливо аналізувати одразу після забору крові, зразок (зразки) можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів. Слід уникати використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування (максимум два цикли заморозки/розморозки перед використанням). Для аналізу в дублях потрібно 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях низького, середнього та високого діапазонів кривої доза-ефект для контролю ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки із визначенням значення в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися графіки контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про непомічені зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Буфер для промивання

Розвести концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігати при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

Примітка: Не використовувати реагенти, які мають ознаки забруднення чи бактеріального росту.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедура тестування повинна виконуватися кваліфікованим фахівцем****

- Відформатувати лунки мікропланшетів для кожного референсного матеріалу сироватки, контролю та зразка пацієнта для аналізу у дублях. Повернути невикористані смужки мікролунок назад в алюмінієвий пакет, герметично закрити та зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- Внести піпеткою по 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) відповідного референсного калібратора сироватки, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Внести 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) ферментного реагенту ПТГ 2-го покоління в кожну лунку. Дуже важливо розподілити всі реагенти поблизу дна лунки з нанесенням.
- Обережно обертати мікропланшет протягом 20-30 секунд, закрити та інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видалити вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо використовувалася декантація, постукати та висушити пластину абсорбуючим папером.
- Внести 0.350 мл (ml) (350 мкл (µl)) буфера для промивання (див. розділ «Підготовка реагентів»), виконати декантацію (постукати і висушити) або аспірацію. Повторити процедуру ще два (2) рази (загальна кількість циклів промивки – три (3)). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка-дозатор, необхідно заповнити кожну лунку, витискаючи контейнер (уникати утворення повітряних бульбашок). Видалити розчин для промивання і повторити ще два (2) рази.
- Внести по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) субстрату ТМБ в кожну лунку (див. «Підготовка реагентів»). **Завжди вносити реагенти в одній і тій же послідовності, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ВНЕСЕННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубувати двадцять (20) хвилин при кімнатній температурі.
- Внести в кожну лунку 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) стоп-розчину і обережно перемішати протягом 15-20 секунд. Завжди вносити реагенти в одній і тій же послідовності, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Зчитати значення абсорбції в кожній лунці на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 630 нм (nm), щоб мінімізувати неточності) у мікропланшетному рідері. Зчитати результати протягом п'ятнадцяти (15 хвилин) після внесення стоп-розчину.

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 1000 пг/мл (pg/ml) слід провести розведення в сироватці або плазмі людини з низькими значеннями ПТГ і відповідно помножити на коефіцієнт розведення.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ПТГ в невідомих зразках використовується крива **доза-ефект**.

- Побудувати графік абсорбції для кожного референсного матеріалу сироватки в дублях відповідно до концентрації ПТГ в пг/мл (pg/ml) на міліметровому папері (перед тим, як будувати графік, не слід виводити середнє дублів референсного матеріалу сироватки).
- Накреслити криву, яка найкраще підходить, через прокладені точки.
- Концентрація ПТГ для кожного невідомого зразка залежить від середнього значення абсорбції дублів на вертикальній осі графіка і точки перетину на кривій. Необхідно зчитати концентрацію (у пг/мл (pg/ml)) з горизонтальної осі графіка (можуть бути виведені середні значення дублів невідомого, як зазначено). У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (1800) перетинає криву доза-ефект при концентрації ПТГ 419 пг/мл (pg/ml) (див. Малюнок 1).

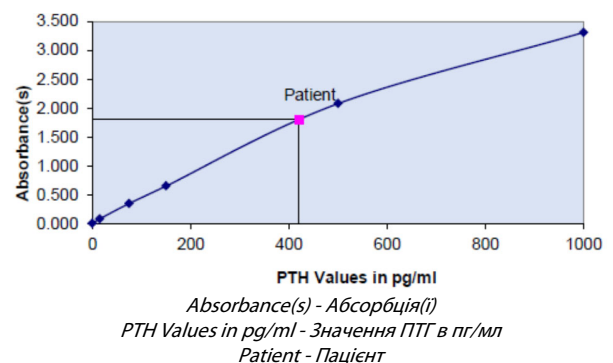
Примітка: Якщо для обробки результатів аналізу даних ІФА використовується комп'ютер, необхідно виконати процедуру валідації програмного забезпечення.

ПРИКЛАД 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (пг/мл (pg/ml))
Калібратор А	A1	0.013	0.015	0
	B1	0.017		
Калібратор В	C1	0.082	0.091	15
	D1	0.106		
Калібратор С	E1	0.370	0.357	75
	F1	0.355		
Калібратор D	G1	0.677	0.657	150
	H1	0.647		
Калібратор E	A2	2.103	2.079	500
	B2	2.065		
Калібратор F	C2	3.265	3.308	1000
	D2	3.360		
Зразок	E2	1.801	1.800	419
	F2	1.800		

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої доза-ефект, яка має бути підготовлена для кожного аналізу.

Малюнок 1



*Якщо показник абсорбції виходить за межі шкали або перевищує середній показник абсорбції найвищого калібратора, зразок слід повторити з розведенням.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Максимальна абсорбція (Калібратор «F») ≥ 1.3
- Чотири з шести контрольних пулів якості 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. Ефективність аналізу

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати десять (10) хвилин, щоб уникнути «дрейфування» аналізу.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один (1) планшет, рекомендується повторювати криву доза-ефект.
- 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.
- Зчитування на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся дна мікролунок.
- Неповне видалення розчину під час аспірації або декантації може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовувати компоненти тільки з однієї партії. Не змішувати реагенти з різних партій.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind інструкцій можуть давати невірні результати.
- Для забезпечення відповідності та належного використання приладу необхідно суворо дотримуватися всіх застосованих національних стандартів, правил і законів, включаючи належні лабораторні процедури, але не обмежуючись ними.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є регулярний технічний догляд пристрою.
- 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

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись кваліфікованими фахівцями.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів прийнятні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених діапазонів та вимог аналізу.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, що спричинило хибні результати, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення калібраторів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- «Реагенти для процедур тест-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 слід використовувати результати цього аналізу в поєднанні з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та іншими клінічними результатами.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рівень інтактного ПТГ вимірювали у п'ятдесяти восьми (58) осіб із уявною нормою. Отримані значення коливались від **9.0 до 94 пг/мл (pg/ml)**. На основі статистичних тестів на асиметрію та ексцес, популяція, перетворюючись логарифмічно, дотримується нормального або Гаусового розподілу, як показано на гістограмах. Середнє геометричне значення ± 2 стандартних відхилення середнього значення було розраховано і становить **10.4-66.5 пг/мл (pg/ml)**.

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції людей з уявною нормою 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 покладатися на діапазон очікуваних значень встановлений виробником лише до тих пір, поки аналітики не визначать внутрішній діапазон за допомогою методу на основі даних місцевої популяції.

14.0 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність цього набору в межах аналізу була визначена за допомогою аналізу шести різних рівнів контролю пулу та сироватки пацієнтів. Середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток наведені в Таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Дані про точність для цього набору

Зразок	Середнє значення (пг/мл (pg/ml))	Точність в межах аналізу		Загальна точність (n=80)	
		SD	CV%	SD	CV%
Контроль 1	20.7	1.29	6.23	5.93	8.96
Контроль 2	66.1	2.88	4.35	8.47	4.65
Контроль 3	182.2	4	2.2	21.47	4.89
Пацієнт 1	438.7	12.44	2.84	26.42	4.39
Пацієнт 2	601.9	15.1	2.51	38.54	5.81
Пацієнт 3	663.7	19.72	2.97	5.93	8.96

*Виміряно в сорока експериментах у дублях протягом 20 днів.

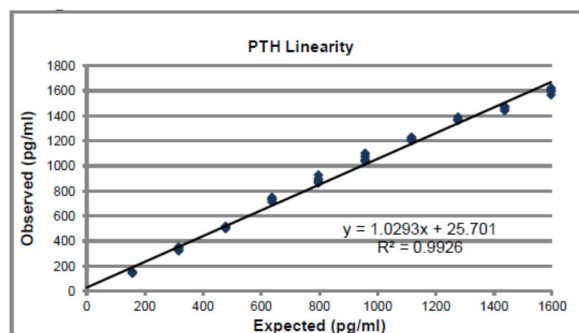
14.2 Чутливість

Цей набір має LoB=1.393 пг/мл (pg/ml) і LoD=LoQ=1.501 пг/мл (pg/ml).

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність цього набору перевіряли шляхом розведення зразків сироватки крові людини, що містять високі рівні ПТГ (494-1597 пг/мл (pg/ml)), з референсною сироваткою «0 пг/мл (pg/ml)». Система показала чудову лінійність до 1597 пг/мл (pg/ml), як показано на Малюнку нижче.



PTH Linearity - Лінійність ПТГ
Observed (pg/ml) - Отримане (пг/мл)
Expected (pg/ml) - Очікуване (пг/мл)

14.3.2 Відновлення

Відновлення цього набору було розраховано для п'яти зразків пацієнтів, насичених 50, 150, 250, 550 і 750 пг/мл (pg/ml) ПТГ. Було визначено, що відновлення знаходиться в межах 15% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.4 Специфічність

Наступні фрагменти ПТГ були протестовані і виявлено, що вони не є реактивними.

Пептид	Концентрація (пг/мл (pg/ml))	% Реакційна здатність
1-34 фрагмент	100 000	0.001
1-44 фрагмент	100 000	0.005
7-34 фрагмент	100 000	0.002

14.5 Хук-ефект високої дози

«Хук-ефект високої дози» цього набору оцінювали за допомогою кількох зразків, що містять значні концентрації ПТГ (10 000-75 000 пг/мл (pg/ml)). Тест не показав хук-ефекту до концентрацій 75000 пг/мл (pg/ml). Зразки з концентрацією паратгормону понад 75000 пг/мл (pg/ml) не тестувалися та можуть продемонструвати хук-ефект. Проте всі зразки, які перевищують найвищий калібратор, слід розбавити та виміряти повторно.

Фасування	96 (A)	192 (B)	
Реагент (заповнення)	A	1 мл (набір) / 1 ml (set)	1 мл (набір) / 1 ml (set)
	B	1 мл (набір) / 1 ml (set)	1 мл (набір) / 1 ml (set)
	C	1 (6 мл) / 1 (6 ml)	2 (6 мл) / 2 (6 ml)
	D	1 планшет	2 планшета
	E	1 (20 мл) / 1 (20 ml)	2 (20 мл) / 2 (20 ml)
	F	1 (12 мл) / 1 (12 ml)	2 (12 мл) / 2 (12 ml)
	G	1 (8 мл) / 1 (8 ml)	2 (8 мл) / 2 (8 ml)



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
 100 North Pointe Dr.
 Lake Forest, CA 92630 - USA
 Phone: 949.951.2665
 Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
 100 Норд Поінт Драйв
 Лейк Форест, Каліфорнія 92630 -
 США
 Тел.: 949.951.2665
 Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
 вул. Симона Петлюри, 25
 м. Івано-Франківськ, 76014
 тел.: +38 (0342) 775 122
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

