

НАБІР РЕАГЕНТІВ VAST ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАТИРЕОЇДНОГО ГОРМОНУ ЗАГАЛЬНОГО ТА ІНТАКТНОГО МЕТОДОМ ІФА

Parathyroid Hormone (PTH) 3rd & 2nd Gen Test System

Кат. №: 10025-300A

Дата випуску інструкції: 25-04-2018

Версія: 0



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 інтактного ПТГ (2-е покоління) та загального ПТГ (3-е покоління) у сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

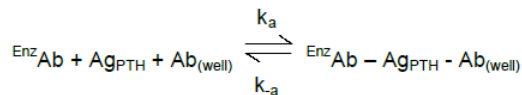
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод рівноваги типу сендвіч (Тип 2):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості 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 х-ПТГ (С-кінцевий епітоп), нанесеного в лунку.

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:



$\text{Ab}_{(\text{well})}$ = Антитіло нанесене в лунці (надмірна кількість)

Ag_{PTH} = Нативний антиген (змінна кількість)

Enz Ab = Помічене ферментами антитіло (надмірна кількість)

$\text{Enz Ab} - \text{Ag}_{\text{PTH}} - \text{Ab}_{(\text{well})}$ = Сендвіч-комплекс Антиген-антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Через достатній час фракція, пов'язана з антитілами, відокремлюється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, прямо пропорційна концентрації нативного антигену. За допомогою декількох різних сироваткових референсних матеріалів з відомими значеннями антигену може бути сформована крива реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію невідомого антигену.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори ПТГ - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізований)

Шість (6) флаконів референсного матеріалу для ПТГ на рівнях 0 (A), 15 (B), 75 (C), 150 (D), 500 (E) та 1000 (F) пг/мл (pg/ml). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). **Розбавте кожен флакон з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Відновлені калібратори стабільні протягом 24-48 годин при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом тривалого періоду, аліквотуйте відновлені калібратори у крио-флакони та зберігайте при -20 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУЙТЕ/РОЗМОРОЖУЙТЕ БІЛЬШЕ, НІЖ ДВА РАЗИ.** Додано консервант.

Примітка: Калібратори на основі людської сироватки можна простежити за 1-м стандартом ВООЗ IS 95/646.

B. Контроль ПТГ - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізований)

Два (2) флакони референсних контролів для ПТГ. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). **Розбавте кожен флакон з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Відновлені калібратори стабільні протягом 24-48 годин при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом тривалого періоду, аліквотуйте відновлені калібратори у крио-флакони та зберігайте при -20 °C (°C). **НЕ ЗАМОРОЖУЙТЕ/РОЗМОРОЖУЙТЕ БІЛЬШЕ, НІЖ ДВА РАЗИ.** Додано консервант.

C. Ферментний реагент ПТГ 2-го покоління - 6 мл (мл)/флакон

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

D. Ферментний реагент ПТГ 3-го покоління - 6 мл (мл)/флакон

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

E. Пластина, покрита антитілами до ПТГ - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антитілом х-ПТГ. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

F. Концентрат промивного розчину (20x) - 20 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон містить ПАР у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Див. розділ Приготування реагенту.

G. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон

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

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

I. Інструкція.

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

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

Примітка 3: Вищевказані компоненти призначені для одного 96-лункового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Дозатор з можливістю подавати об'єми 0.50 мл (мл) (50 мкл (μl)) та 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач 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 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. 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 повинна бути сироватка або плазма ЕДТА за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для точного порівняння із встановленими нормальними значеннями слід отримати зразки сироватки вранці натще. Кров слід збирати в звичайну пробірку для венепункції без додатків або антикоагулянтів для сироватки або в пробірку, що містить ЕДТА, для плазми. Дайте крові

згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Якщо зразок(и) неможливо аналізувати одразу після забору крові, зразок (зразки) може зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування (максимум два цикли заморожування/розморожування 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 у низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу результатів 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 (ml) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°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 (°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 (°C).
- Внесіть 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) відповідного сироваткового референсного матеріалу, контролю або зразка у призначену лунку.

ДЛЯ 2-го Покоління

- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) ферментного реагенту х-ПГТ 2-го покоління в кожну лунку. Дуже важливо розподілити всі реагенти поблизу дна лунки з покриттям.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, закрийте та інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.

АБО 3-го Покоління

- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) ферментного реагенту х-ПГТ 3-го покоління в кожну лунку. Дуже важливо розподілити всі реагенти поблизу дна лунки з покриттям.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, закрийте та інкубуйте протягом 75 хвилин (1 год 15 хв) при кімнатній температурі, використовуючи шейкер для пластин при 150-200 об/хв (rpm) або протягом двох (2) годин без струшування.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 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 кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) робочого розчину субстрату у всі лунки (див. Розділ «Підготовка реагенту»). Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 630 нм

(nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 1000 пг/мл (pg/ml) слід проводити розведення сироватки або плазми людини з низькими значеннями ПГТ і відповідно множити.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації ПГТ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації ПГТ в пг/мл (pg/ml) на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід виводити середнє значення дублів референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію ПГТ 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 (дублі невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі для ПГТ 2-го Покоління середня абсорбція (1800) перетинає криву реакції на дозу при концентрації ПГТ 419 пг/мл (pg/ml) (див. Малюнок 1). Для ПГТ 3-го Покоління середня абсорбція (0.265) перетинає криву реакції на дозу при концентрації ПГТ 78.5 пг/мл (pg/ml) (див. Малюнок 2).

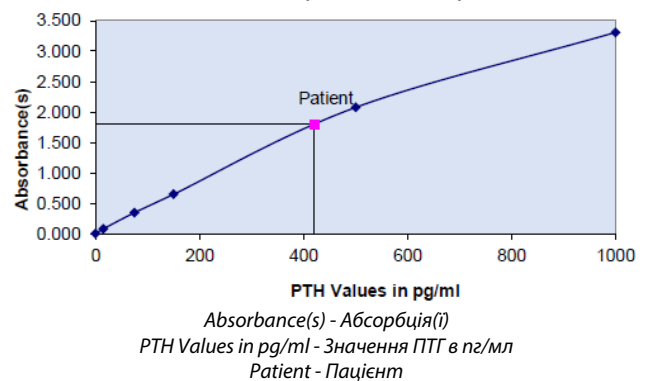
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

I.D. зразка	Номер лунки	Abs (A)	Середнє Abs (B)	Значення (пг/мл (pg/ml))
Cal A	A1	0.013	0.015	0
	B1	0.017		
Cal B	C1	0.082	0.091	15
	D1	0.106		
Cal C	E1	0.370	0.357	75
	F1	0.355		
Cal D	G1	0.677	0.657	150
	H1	0.647		
Cal E	A2	2.103	2.079	500
	B2	2.065		
Cal F	C2	3.265	3.308	1000
	D2	3.360		
Пацієнт	E2	1.801	1.800	419
	F2	1.800		

ПРИКЛАД 1 (2-ге Покоління)

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і не повинні використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

Малюнок 1 (2-ге Покоління)

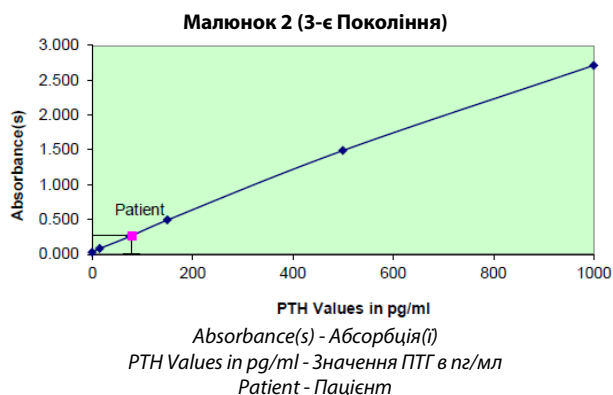


*Якщо показник абсорбції не відповідає шкалі або перевищує середнє поглинання найвищого калібратора, зразок слід повторити з розведенням.

ПРИКЛАД 2 (3-тє Покоління)

I.D. зразка	Номер лунки	Abs (A)	Середнє Abs (B)	Значення (пг/мл (pg/ml))
Cal A	A1	0.030	0.030	0
	B1	0.030		
Cal B	C1	0.084	0.083	15
	D1	0.082		
Cal C	E1	0.260	0.255	75
	F1	0.250		
Cal D	G1	0.491	0.492	150
	H1	0.493		
Cal E	A2	1.495	1.490	500
	B2	1.486		
Cal F	C2	2.781	2.713	1000
	D2	2.646		
Пацієнт	E2	0.260	0.265	78.5
	F2	0.270		

*Дані, наведені в прикладі 2 та на малюнку 2, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.



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

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F») ≥ 1.2
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. Для дійсних результатів випробувань адекватні засоби контролю та інші параметри повинні відповідати переліченим діапазонам та вимогам до аналізу.
4. 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.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. 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.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Рівень інтактного ПТГ вимірювали у п'ятдесяти восьми (58), очевидно, нормальних людей. Отримані значення коливались від 9.0 до 94 пг/мл (pg/ml). На основі статистичних тестів на зміщення та ексцес, популяція, перетворюючись логарифмічно, дотримується нормального або Гауссового розподілу, як показано на гістограмах. Середнє геометричне значення ± 2 стандартних відхилення середнього значення було підраховано від 10.4 до 66.5 пг/мл (pg/ml).

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності "нормальних" людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, тестованої популяції і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

14.0 СПЕЦИФІЧНІСТЬ

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

2-ге Покоління

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

3-є Покоління

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
7-84 фрагмент	100 000	0.003



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 Поїнт 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

