

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОГО РЕНИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

RE53321, Renin (active) ELISA

Каталог. № : RE53321
Количество : 96
Производитель: IBL (Германия)

Методика от 12-2015
Версия 9.0



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

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Назначение использования

Ренин (активный) ИФА – это набор для иммуноферментного анализа, который предоставляет материалы для количественного определения активного Ренина в сыворотке и плазме.

1.2 Обобщения и объяснение (См. оригинал инструкции).

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Набор ИФА Ренин (активный) представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) на основе принципа сэндвича. Микротитровальные лунки покрыты моноклональными [мышинными] антителами, направленными против уникального антигенного сайта человеческой активной молекулы ренина. Аликвота образца пациента, содержащего эндогенный ренин, инкубируется в лунке вместе с буфером. После инкубации несвязанные компоненты вымываются. Наконец, добавляется Ферментный конъюгат, который представляет собой моноклональное анти-ренин антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена, а после инкубации несвязанный фермент конъюгата вымывается.

Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации ренина в образце.

При добавлении раствора субстрата, интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации активного ренина в образце пациента.

3. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для использования в In-vitro диагностике. Только для профессионального использования.
2. Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были протестированы и найдены отрицательными к ВИЧ 1/2, HbsAg и HCV, используя установленные процедуры. Тем не менее, обращайтесь со всеми реагентами как с потенциальным источником инфекции.
3. Перед началом проведения теста полностью и внимательно прочитайте инструкцию. Использовать действующую версию инструкции, предоставленной с набором. Убедиться в том, что все понятно.
4. Планшет состоит из отрываемых стрипов. Неиспользованные лунки необходимо хранить при 2-8 °C запечатанными и использовать с поставляемым держателем.
5. Пипетирование образцов и реагентов проводить как можно быстрее и с одинаковыми интервалами для каждого шага.
6. Использовать резервуары только для одиночных реагентов. Это особенно касается емкостей для субстрата. Использование резервуара для раствора субстрата, который использовался для раствора конъюгата, может привести к окрашиванию раствора. Не возвращать реагенты обратно в пробирки, это может привести к загрязнению.
7. Тщательно смешивать содержимое лунок для получения хороших результатов теста. Не использовать микролунок повторно.
8. Не допускать высыхания лунок во время анализа; добавлять реагенты немедленно после завершения шагов промывки.
9. Позволить реагентам достичь комнатной температуры (21-26 °C) перед началом анализа. Температура влияет на результаты плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты анализа пациентов.
10. Никогда не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.

11. Не курить, не употреблять пищу и напитки, не наносить косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
12. Использовать одноразовые перчатки при работе с образцами и реагентами. Микробное загрязнение реагентов может привести к ложным результатам.
13. Следовать правилам лабораторной практики и соблюдать правила техники безопасности.
14. Не использовать просроченные реагенты.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться. Оптимальные результаты теста будут получены только при использовании калиброванных пипеток и микропланшетных ридеров.
16. Не смешивать и не использовать реагенты из разных партий. Рекомендуется не перемешивать лунки разных планшетов даже из одной партии. Наборы могли транспортироваться или храниться при разных условиях и связывающие характеристики планшетов могут отличаться.
17. Избегать контакта со Стоп раствором, содержащим 0.5M H₂SO₄. Это может вызвать раздражение или ожоги кожи.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, BND и/или MIT в качестве консервантов. В случае контакта с глазами или кожей немедленно промыть с большим количеством воды.
19. Субстрат ТМБ оказывает раздражающее действие на кожу и слизистые. В случае возможного контакта, промыть глаза водой и кожу мылом и водой. Вымыть загрязненные объекты перед их повторным использованием. При вдыхании выйти на свежий воздух.
20. С химикатами и приготовленными или использованными реагентами обращаться как с опасными отходами в соответствии с национальными правилами по биологической безопасности.
21. Реагенты данного набора, содержащие опасные материалы, могут вызвать раздражение глаз и кожи. За деталями обратитесь к разделу ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ и этикеткам. Данные по безопасности данного продукта доступны на веб-странице IBL или по запросу непосредственно от IBL.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые материалы

1. **Микротитрационные лунки**, 12x8 (делимые), 96 лунок; Лунки покрыты антителом анти-человеческого Ренина (моноклональным).
2. **Стандарт (Стандарт 0-5)**, 6 флаконов (лиофилизированный), 1 мл; Концентрации: 0; 4; 16; 32; 64; 128 пг/мл Преобразование: 1 пг/мл = 1.44 мкLU/мл Стандарты откалиброваны по первому Международному стандарту ВОЗ для ренина 68/356 см. "Подготовка реагентов" Содержит консервант.
3. **Контроль (Низкий и высокий)**, 2 флакона (лиофилизированный), 1 мл Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетках или в листе Контроля качества. см. "Подготовка реагентов" Содержит консервант.
4. **Рабочий Буфер**, 1 флакон, 20 мл, готов к использованию, Содержит консервант.
5. **Ферментный Конъюгат 11X Концентрат**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию Антитела к анти-человеческому Ренину (моноклональные); HRP конъюгированные. Содержит нертутный консервант.
6. **Раствор Субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
7. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0.5 M H₂SO₄. Избегать контакта со Стоп раствором. Может вызвать раздражения кожи и ожоги.
8. **Промывочный Раствор**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрированный), см. "Подготовка реагентов".

Примечание: Дополнительный *Рабочий Буфер* для разбавления образцов доступен под заказ.

4.2 Требуемые, но не поставляемые материалы

- Считывающее устройство микропластины (450 ± 10 nm).
- Калиброванные микропипетки различной точности.
- Впитывающая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов.

4.3 Условия хранения

При хранении при температуре 2-8 °C в нераспечатанной упаковке реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не используйте реагенты после этой даты.

Открытые реагенты должны храниться при температуре 2-8 °С. Микротитровальные лунки должны храниться при температуре 2-8 °С. Как только упаковка была вскрыта, следует позаботиться, чтобы ее снова плотно закрыть. Открытые наборы сохраняют активность в течение шести недель при хранении, как описано выше.

4.4 . Подготовка реагентов

Привести все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре перед использованием.

Стандарты

Восстановить лиофилизированный стандарт с 1 мл дистиллированной воды и оставить минимум на 10 минут. Перемешать стандарты несколько раз перед использованием.

Примечание: Восстановленные Стандарты стабильны в течение 14 дней при 2-8 °С. Для более длительного хранения заморозить при -20 °С.

Контроли

Восстановить лиофилизированное содержимое с 1 мл дистиллированной воды и оставить минимум на 10 минут. Перемешать несколько раз перед использованием.

Примечание: Восстановленные Контроли стабильны в течение 14 дней при 2-8 °С. Для более длительного хранения заморозить при -20 °С.

Промывочный Раствор

Добавить деионизированной воды к 40X Концентрату Промывочного Раствора.

Развести 30 мл концентрированного Промывочного Раствора со 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Разведенный Промывочный Раствор стабилен в течение 2 недель при комнатной температуре.

4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна быть проведена в соответствии с национальными предписаниями компетентных служб. Специальная информация для данного продукта приведена в паспорте по технике безопасности.

4.6 Поврежденные тестовые наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, производитель должен быть информирован в письменной форме не позднее одной недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться для тестового запуска. Они должны быть сохранены до принятия окончательного решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с предписаниями компетентных служб.

5. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

В данном анализе могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТК- или гепариновая плазма).

Не использовать гемолитические, иктерические или липемические образцы.

Замечание: Не использовать образцы, содержащие NaN_3 .

Условия, при которых проводится забор образцов, необходимо тщательно контролировать, поскольку ряд физиологических факторов могут влиять на секрецию ренина. К ним относятся:

- **Положение:** пациент должен находиться в горизонтальном положении в течение более 1 часа или в вертикальном положении в течение более 1 часа
- **Ежедневные колебания Ренина:** забор образцов проводить в период с 7 до 10 утра, если это возможно.
- **Диета:** содержание натрия в рационе должно быть известно и в конечном счете проверяется измерением *patruiria* в течение 24 часов
- **Лекарства:** на уровень активного ренина могут повлиять антигипертензивные препараты (например, диуретики, ингибиторы АПФ, бета-блокирующие адренергические агенты, или вазодилататоры, ингибиторы ренина)
- **Беременность:** уровень неактивного и активного Ренина увеличивается во время беременности
- **Менструальный цикл:** уровень активного ренина возрастает на второй фазе цикла (отбор образцов должен проводиться, если это возможно, в ходе первого этапа)
- **Возраст:** уровень активного Ренина снижается с возрастом

ПРИМЕЧАНИЕ:

Сыворотка от пациентов с раковыми заболеваниями может содержать повышенные уровни Ренина.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Провести забор крови из вены (например, Sarstedt Monovette для сыворотки), дать свернуться, отделить сыворотку

центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Пациентам, проходящим антикоагулянтную терапию, может потребоваться больше времени для свертывания.

Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт (например, Sarstedt Monovette, с соответствующей подготовкой плазмы), и центрифугирована сразу после сбора.

5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрыты крышками и храниться при комнатной температуре, НО НЕ при температуре 2-8 °С до проведения анализа.

Если образцы не могут быть проанализированы в течение 4 часов после забора, хранить их замороженными при -20 °С или ниже. Рекомендуется быстро заморозить и разморозить обрабатываемые образцы, избегая температурного диапазона 2-8 °С. Сухой лед/этаноловая ванна могут быть использованы для быстрых процедур замораживания.

5.3. Разведение образцов

Если в изначальном анализе образец имеет концентрацию, превышающую значение наивысшего Стандарта, образец может быть разбавлен Рабочим Буфером и проанализирован повторно.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

Пример:

- разведение 1:2: 75 мкл сыворотки + 75 мкл Рабочего Буфера (тщательно перемешайте)
- разведение 1:5: 30 мкл сыворотки + 120 мкл Рабочего Буфера (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть приведены к комнатной температуре перед использованием. Все реагенты должны быть перемешаны без образования пены.
- После того как тест был запущен, все шаги должны быть завершены без перерыва.
- Использовать новые одноразовые наконечники для пипеток для каждого стандарта, контроля или образца во избежание перекрестного загрязнения.
- Поглощение является функцией времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в держателе и т.д. Это обеспечит одинаковые промежутки времени для каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура теста

Каждый прогон должен включать стандартную кривую.

1. Закрепить необходимое количество лунок в держателе.
2. Внести **150 мкл Рабочего Буфера** в соответствующие лунки.
3. Внести **50 мкл** каждого **Стандарта, Контроля и образцов новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки.
4. Инкубировать **90 минут** при комнатной температуре на шейкере со скоростью 300-700 об/минуту.
5. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **4 раза** разведенным **Промывочным раствором (300 мкл)**. Ударить лунками резко по салфетке, чтобы удалить оставшиеся капли.
Важное примечание: Чувствительность и точность этого анализа зависят от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Внести **100 мкл Ферментного конъюгата** в каждую лунку.
7. Инкубировать **90 минут** при комнатной температуре на шейкере со скоростью 300-700 об/минуту.
8. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **4 раза** разведенным **Промывочным раствором (300 мкл)**. Ударить лунками резко по салфетке, чтобы удалить оставшиеся капли.
9. Добавить **100 мкл Раствора субстрата** в каждую лунку.
10. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
11. Остановить ферментативную реакцию добавлением **100 мкл Стоп раствора** в каждую лунку.
12. Считать оптическую плотность при **450±10 нм** при помощи микропланшетного считывателя **в течение 10 минут** после добавления **Стоп раствора**.

6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациентов.
2. Построить стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта, против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрацией на горизонтальной (X) оси.
3. Используя среднее значение абсорбции для каждого образца определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматический метод: Результаты в IFU были рассчитаны автоматически с помощью 4 PL (4-параметровая логистика) кривой. Другие методы обработки данных могут давать несколько отличающиеся результаты.
5. Концентрация образцов может быть считана непосредственно со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем самый высокий Стандарт, должны быть дополнительно разбавлены или заявлены как > 128 пг/мл. Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Пример типичной Стандартной Кривой

Следующие данные приведены только в качестве примера, и не могут быть использованы вместо полученных во время анализа результатов.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Стандарт 0 (0 мкг/мл)	0.09
Стандарт 1 (4 мкг/мл)	0.19
Стандарт 2 (16 мкг/мл)	0.44
Стандарт 3 (32 мкг/мл)	0.78
Стандарт 4 (64 мкг/мл)	1.14
Стандарт 5 (128 мкг/мл)	2.48

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

В исследовании, проведенном на очевидно здоровых взрослых, используя ренин (активный) ELISA, следующие значения наблюдаются в плазме:

	n	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	99 th percentile (pg/mL)	95 th percentile (pg/mL)	5 th percentile (pg/mL)	1 st percentile (pg/mL)
Healthy donors supine position	26	17.72	15.31	35.64	31.90	4.66	2.99
Healthy donors upright position	26	23.95	23.27	47.85	42.30	7.54	3.84

В исследовании, проведенном с очевидно здоровым взрослым населением, используя Альдостерон ELISA и Ренин (активный) ELISA, были получены следующие в плазме:

n	Mean	Median	99 th percentile	95 th percentile	5 th percentile	1 st percentile
89	8.68	5.30	49.65	28.06	0.68	0.45

Только одни результаты не должны быть единственной причиной для каких-либо терапевтических заключений. Результаты должны быть соотнесены с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечить повседневной достоверности результатов. Используйте контроли как нормальных, так и патологических уровней.

Контроли и соответствующие результаты QC-лаборатории указаны в сертификате контроля качества, вложенном в набор. Значения и диапазоны, указанные в листе QC всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Кроме того, рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.

Применяйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не сходятся с установленными приемлемыми диапазонами контрольных материалов, результат пациента считается недействительным.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические направления: приборы для пипетирования; фотометр, сроки годности реагентов, условия его хранения и инкубации, методы асциации и промывки.

После проверки указанных выше пунктов, не находя никакой ошибки обратитесь к своему дистрибьютору или производителю напрямую.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0.81 - 128 пг/мл.

9.2 Специфичность антител (Перекрестная реактивность)

Следующие вещества были проверены на перекрестную реактивность анализа:

Средняя перекрестная реактивность с Проренином составила 0.71% (среднее значение, когда Проренин был насыщен в диапазоне концентраций 256-4096 пг/мл). Тем не менее, наблюдаемая перекрестная реактивность может представлять только интерференцию подготовленного рекомбинантного Проренина с активным Ренином из-за авто-активации.

Перекрестная реактивность не была обнаружена относительно человеческого сывороточного альбумина, человеческого гамма-Глобулина, человеческого Гепсидина и Пепсина.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность рассчитывалась из среднего значения плюс два стандартных отклонения из двадцати (20) повторных анализов 0 Стандарта, и составила 0.81 пг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Вариации внутри анализа

Вариативность внутри анализа приведена в таблице ниже:

Образец	n	Среднее (пг/мл)	CV (%)
1	20	9.12	8.73
2	20	26.98	3.88
3	20	43.99	4.24

9.4.2 Вариации между анализами

Вариативность между анализами приведена в таблице ниже:

Образец	n	Среднее (пг/мл)	CV (%)
1	12	19.28	8.88
2	12	36.20	6.27
3	12	66.72	5.19

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением растворов Ренина с известными концентрациями в соотношении 1:1.

Восстановление в % была рассчитано путем умножения коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100 (ожидаемое значение = (эндогенный Ренин + добавленный Ренин)/2; из-за разведения 1: 2 плазмы с материалом обогащения).

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
Concentration [pg/mL]	16.71	40.21	15.97	
Average Recovery	92.92	95.09	96.00	
Range of Recovery [%]	from	85.99	87.93	86.83
	to	105.47	101.37	105.25

9.6 Линейность

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
Concentration [pg/mL]	45.16	53.20	126.0	
Average Recovery	101.7	102.8	98.5	
Range of Recovery [%]	from	96.7	95.6	94.9
	to	108.6	114.6	100.8

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены при проведении анализа с полным пониманием инструкции и с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого теста могут повлиять на результаты.

10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 1 мг/мл), Билирубин (до 0.5 мг/мл) и Триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

Ингибитор ренина Алискирен увеличит иммунореактивность активного ренина в зависимости от дозы, с 0,54 мкМ (+ 121%) до 540 мкМ (+151%).

Кроме того, уровень активного ренина в плазме может зависеть от антигипертензивных препаратов (например, диуретиков, ингибиторов АПФ, бета-адренергических блокирующих агентов или вазодилаторов)

10.3 Хук-эффект высокой дозы

Хук-эффект высокой дозы не наблюдался в этом тесте до 8.200 пг/мл Ренина.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться точно в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правил GLP (Good Laboratory Practice) или других применимых национальных стандартов и/или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Всегда важно включать, в пределах процедуры испытания, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты испытаний действительны, только, если все Контроли находятся в пределах указанных диапазонов и, если все другие параметры испытания также в пределах, указанных в спецификации анализа. В случае каких-либо сомнений или беспокойства обращайтесь к изготовителю.

11.2 Терапевтические последствия

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если все результаты испытаний находятся в соответствии с пунктами как указано в 11.1. Любой лабораторный результат лишь часть от общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований находятся в приемлемом согласии с общей клинической картиной пациента, можно делать терапевтические заключения.

Сам результат теста не должен быть единственным фактором, являющимся определяющим для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение в тестовом наборе и/или обмен или перемешивание любых компонентов из разных партий одного теста набора на другой может негативно повлиять на предполагаемые результаты и достоверность теста в целом. Такая модификация и/или обмен аннулируют претензии на замену.

Претензии, предъявленные в связи с клиентской неправильной интерпретацией результатов лабораторных исследований, также недействительны. Несмотря на это, в случае любых претензий, ответственность производителя не должна превышать стоимость тестового набора. Любой ущерб, причиненный тестовому набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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