

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЦИРКУЛЮЮЧОГО ФЕРИТИНУ

2825-300, Ferritin Test System

Каталог. №: 2825-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 16-07-2019

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 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цільове використання: Кількісне визначення концентрацій циркулюючого Феритину в сироватці людини, за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

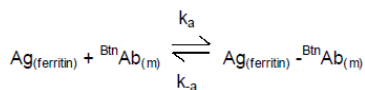
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (ТИП 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до Феритину.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл і сироватки, що містить нативний антиген, між Феритином і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$B^{tn}Ab_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$Ag_{(ferritin)}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$Ag_{(ferritin)} - B^{tn}Ab_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

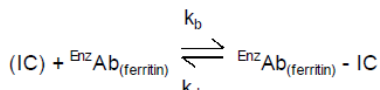
k_a = Константа швидкості дисоціації



$\text{Стрептавідин}_{с.в.}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



де $EnzAb_{(ferritin)}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

Перекладач Зеленьська Т. І.

$EnzAb_{(ferritin)} - IC$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_b = константа швидкості дисоціації

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Феритину – 1 мл/флакон

6 флаконів калібраторів Феритину з концентраціями 0 (A), 10 (B), 50 (C), 150 (D), 400 (E) і 800 (F) нг/мл. В зразки додані консерванти. Зберігати при 2-8 °C.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по 3-му Міжнародному стандарту WHO IS 94/572.

B. Біотиновий реагент Феритину – 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить біотинильований моноклональний мишачий IgG у буфері, барвнику та консерванті. Зберігати при температурі 2-8 °C.

C. Ферментний Реагент Феритину - 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить IgG анти-феритину, мічені пероксидазо хрому (HRP), в буфері, з барвником та консервантами. Зберігати при температурі 2-8 °C.

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

F. Субстрат А - 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Субстрат В - 7 мл/флакон

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

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки 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**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована 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, NHS.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень

повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні в низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу 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 температурі 2-30 °C до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додати 0.100 мл (100 мкл) Біотинового Реагенту Феритину в кожну лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубувати 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- 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 Ферментного реагенту Феритину у кожну лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО РЕАГЕНТУ

- Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3).

- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів").

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Феритину в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Феритину в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Феритину в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.287 перетинає стандартну криву при 154 нг/мл (див. мал. 1)

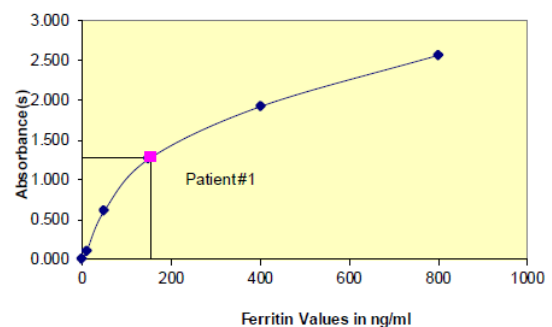
Примітка: Програмне забезпечення для аналізу даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для аналізу даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити програмне забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація (нг/мл)
Калібратор А	A1	0.002	0.003	0
	B1	0.003		
Калібратор В	C1	0.110	0.112	10
	D1	0.113		
Калібратор С	E1	0.586	0.617	50
	F1	0.647		
Калібратор D	G1	1.204	1.262	150
	H1	1.320		
Калібратор Е	A2	1.947	1.917	400
	B2	1.887		
Калібратор F	C2	2.586	2.561	800
	D2	2.536		
Контроль 1	E2	0.707	0.721	66.1
	F2	0.734		
Пацієнт 1	G2	1.289	1.287	154.0
	H2	1.285		
Пацієнт 2	A3	1.647	1.659	301.6
	B3	1.671		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора F \geq 1.8.
2. Оптична щільність калібратора A \leq 0.05.
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризиків для цього продукту доступні на запит 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 для даного пристрою може бути наданий Monobind.

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 тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних досліджень", Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі 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 невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Зразки пацієнта з концентрацією Феритину вище 800 нг/мл можуть бути розведені (наприклад 1/10) з нормальною сироваткою вільною від Феритину і повторно аналізовані. Концентрація зразка визначається шляхом множення результату на коефіцієнт розведення (10).
8. Кожен компонент в одному аналізі повинен бути того ж номера партії і зберігатись в однакових умовах.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Орієнтовні референтні діапазони для нормальних дорослих чоловіків і жінок були визначені за допомогою 400 нормальних сироваток з Тест-системою ІФА AccuBind™ Феритин.

Чоловіки	16-220 нг/мл
Жінки	10-124 нг/мл

На додаток до вищесказаного наступні діапазони були встановлені на основі доступної літератури. Тим не менше, ці діапазони були підтверджені за допомогою мікропланшетного ІФА аналізу AccuBind™ Феритин з обмеженим числом зразків.

Новонароджені	22-220 нг/мл
1-2 місяці	190-610 нг/мл
2-5 місяців	50-220 нг/мл
6 місяців-16 років	10-160 нг/мл

Важливо мати на увазі, що встановлення будь-якого нормального діапазону залежить від безлічі факторів, таких як специфічність методу, місцевість, тестованої популяції і точності методу в руках фахівців. З цих причин кожна лабораторія залежить від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки не буде встановлено власний діапазон техніками лабораторії з використанням методу з корінним населенням в районі, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору Феритин всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	43.5	1.36	3.1
Рівень 2	20	110.5	6.10	5.5
Рівень 3	20	349.6	7.54	2.2

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	41.2	2.33	5.5
Рівень 2	10	113.2	8.11	7.2
Рівень 3	10	372.4	11.80	3.2

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Мінімальна доза (чутливість) визначається як видима концентрація 2 σ вище оптичної щільності нульового калібратора. 2 σ середньої оптичної щільності протягом двадцяти повторів нульового калібратора для тест-системи ІФА AccuBind™ Феритин дає чутливість 0.17 нг/мл.

14.3 Специфічність

Перехресна реактивність даного методу визначення Феритину з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироваткової матриці в різних концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози інтерферуючої речовини до дози Феритину, необхідного для одержання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність
Феритин печінки	100%
Феритин селезінки	100%
Феритин серця людини	< 1.0%
Гемоглобін	< 0.1%

14.4 Ефект високої дози

Оскільки аналіз є послідовним, високі концентрації Феритину не показують хук-ефект. Зразки з концентраціями більше 50000 нг/мл продемонстрували надзвичайно високі рівні поглинання.



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

