

НАБІР РЕАГЕНТІВ

РЕНІН ELISA

Renin ELISA

Кат. №: **EIA-5125**

Дата випуску інструкції: **2015/12**
Версія **9.0**



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

1 ВВЕДЕННЯ

1.1 Найменування і призначення

Набір **DRG Ренін ELISA** - це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro* визначення Реніну у сироватці та ЕДТА плазми.

2 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Даний набір - це ферментний імуносорбентний аналіз твердої фази (ELISA) на основі принципу сендвіча.

Мікротитрувальні лунки покриті моноклональним [мишачим] антитілом, спрямованим на унікальний антигенний сайт молекули активного Реніну людини. Аліквота зразка пацієнта, що містить ендogenous Ренін, інкубується в лунці з покриттям разом з Буфером для аналізу. Після інкубації незв'язані компоненти вимиваються. Нарешті, додається Ферментний Кон'югат, який є моноклональним антитілом анти-Реніну, кон'югованим з пероксидазою хрому, і після інкубації незв'язаний ферментний кон'югат вимивається. Кількість зв'язаної пероксидази пропорційна концентрації Реніну в зразку. Після додавання розчину субстрату інтенсивність кольору, що розвивається, пропорційна концентрації активного Реніну у зразку пацієнта.

3 ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in-vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
2. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
3. Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °С запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
5. Піпетування взірців та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
7. Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полоскання.
9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26°C) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
16. Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Уникайте контакту зі *Стоп-розчином*, що містить 0.5 M H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. При попаданні в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
20. Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4 РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитраційні лунки:** 12 смужок по 8 лунок (відривні), покритих моноклональними анти-Ренін антитілами людини.
2. **Стандарт (Стандарти 0-5):** 6 флаконів, (ліофілізовані), 1 мл Концентрації: 0-4-16-32-64-128 пг/мл Перетворення: 1 пг/мл = 1.44 мкМО/мл **Стандарти відкалібровані відповідно до 1-го Міжнародного стандарту ВООЗ для Реніну 68/356** див. "Підготовка реагенту" Містить не-ртутний консервант.
3. **Контроль Низький та Високий:** 2 флакони, (ліофілізовані), 1 мл див. "Підготовка реагенту" Містить не-ртутний консервант.
4. **Буфер для аналізу,** 1 флакон, 20 мл, готовий до використання, Містить не-ртутний консервант.
5. **Ферментний кон'югат,** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Антитіла анти-Реніну людини (моноклональні), кон'юговані з пероксидазою хрому. Містить не-ртутний консервант.
6. **Розчин субстрату,** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання. Тетраметилбензидин (ТМБ)
7. **Стоп-розчин,** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Містить 0.5 M H₂SO₄, Уникайте контакту зі *стоп-розчином*. Це може привести до подразнення шкіри і опіків.
8. **Промивний Розчин,** 1 флакон, 30 мл (40X концентрат). Див. «Приготування реагентів»

Примітка: Додатково *Буфер для аналізу* для розведення зразків наявний за запитом.

4.2 Матеріали, що не постачаються, але є необхідними

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450 нм ±10 нм) (наприклад, мікротитровий зчитувач DRG Instruments).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Логарифмічний графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати. Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °С. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний 6 тижнів при зберіганні, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Стандарти

Відновіть ліофілізований вміст стандартного флакона з 1.0 мл дистильованої води і дайте постояти мінімум 10 хвилин. Змішайте стандарти кілька разів перед використанням.

Примітка: Розведені стандарти стабільні протягом 14 днів при 2 °С - 8 °С. Для довшого зберігання заморожуйте при -20 °С.

Контролі

Відновіть ліофілізований вміст з 1.0 мл дистильованої води і дайте постояти мінімум 10 хвилин. Змішайте контролі кілька разів перед використанням.

Примітка: Відновлені контролі стабільні протягом 14 днів при 2 °C - 8 °C. Для довшого зберігання заморожуйте при -20 °C.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40x концентрованого Промивного Розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного Розчину з 1170 мл деіонізованої води до об'єму 1200 мл.

Розведений Промивний Розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.

4.5 Утилізація набору

Утилізація набору повинна проводитись відповідно до вимог місцевого регулювання. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкоджені набори

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати. Вони повинні зберігатись до вирішення проблеми. Після цього вони повинні бути знищені відповідно до вимог місцевого регулювання.

5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У цьому дослідженні можна використовувати сироватку або ЕДТА плазму.

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

Увага: Зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

Умови, при яких відбувається забір зразків, повинні ретельно контролюватися, оскільки ряд фізіологічних чинників може впливати на секрецію реніну. До них відносяться:

- **Положення:** пацієнт повинен був лежати більше 1 години або вертикально протягом більше 1 години
- **Щоденні періодичні зміни Реніну:** забір необхідно проводити з 7 ранку до 10 ранку, якщо це можливо
- **Дієта:** вміст натрію в раціоні має бути відомим і в кінцевому підсумку підтверджений вимірюванням натріюрії протягом 24 годин
- **Ліки:** на рівень активного Реніну можуть впливати антигіпертензивні препарати (наприклад, діуретики, інгібітори АПФ, бета-адренорецептори, судинорозширювальні апарати, інгібітори Реніну)
- **Вагітність:** рівень неактивного та активного Реніну збільшується під час вагітності
- **Менструальний цикл:** рівень активного Реніну збільшується в другій фазі циклу (забір повинен проводитись, якщо можливо, в першій фазі)
- **Вік:** рівень активного Реніну зменшується з віком

ПРИМІТКА:

Зразки пацієнтів з пухлиною можуть містити підвищений рівень Реніну.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте крові згорнутись і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для згортання крові.

Плазма:

Цільну кров слід збирати в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянти (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідною підготовкою для плазми) та центрифугувати відразу ж після збору.

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки слід зберігати закритими при кімнатній температурі, І НЕ зберігати при температурі 2-8 °C перед аналізом, оскільки кріоактивація прореніну може відбуватися в діапазоні температур від 2 °C до 8 °C, що дає помилково позитивні значення активного Реніну.

Якщо зразки не можуть бути аналізовані протягом 4 годин від збору, заморозьте їх при -20 °C або нижче.

Рекомендується швидко заморожувати та розморозувати зразки, уникаючи температурного діапазону від 2 °C до 8 °C.

Суху баню з льоду/етанолу можна використовувати для швидких процедур заморожування.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені Буфером для Аналізу і проаналізовані повторно.

Для вирахування концентрації необхідно брати до уваги коефіцієнт розведення.

Приклад:

- | | |
|--------------------|--|
| a) Розведення 1:2: | 75 мкл зразка + 75 мкл Буфера для Аналізу (ретельно змішайте) |
| b) Розведення 1:5: | 30 мкл зразка + 120 мкл Буфера для Аналізу (ретельно змішайте) |

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакових інтервалів часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура аналізу

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитраційних лунок у штативі.
2. Внесіть **150 мкл Буфера для Аналізу** у всі лунки.
3. Додайте по **50 мкл** кожного **Стандарту, Контролю та зразків** у відповідні лунки кожен раз з новим наконечником.
4. Інкубуйте протягом **90 хвилин** при кімнатній температурі на планшетному шейкері при 300 - 700 об/хв.
5. Вилийте різко вміст лунок.
Промийте лунки **4 рази** розведеним **Промивним Розчином (300 мкл)**. Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
Важлива примітка:
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання!
6. Додайте по **100 мкл Ферментного Кон'югату** в кожную лунку.
7. Інкубуйте **90 хвилин** при кімнатній температурі на планшетному шейкері при 300 - 700 об/хв.
8. Вилийте різко вміст лунок.
Промийте лунки **4 рази** розведеним **Промивним Розчином (300 мкл)**. Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
9. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожную лунку.
10. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
11. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп-Розчину** в кожную лунку.
12. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10 нм** за допомогою мікротитраційного планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання **Стоп-Розчину**.

6.3 Розрахунок результатів

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж концентрація найвищого стандарту, необхідно розбавити або прийняти як > 128 пг/мл. При вирахуванні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані наведені тільки для демонстрації і **не можуть**

використовуватися для отримання результатів під час аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 пг/мл)	0.09
Стандарт 1 (4 пг/мл)	0.19
Стандарт 2 (16 пг/мл)	0.44
Стандарт 3 (32 пг/мл)	0.78
Стандарт 4 (64 пг/мл)	1.14
Стандарт 5 (128 пг/мл)	2.48

7 ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

У дослідженні, проведеному на зразках нормальних здорових дорослих пацієнтів, використовуючи набір DRG Ренін ІФА, були отримані наступні дані.

	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

У дослідженні, проведеному з очевидно здоровими дорослими, з використанням DRG Альдостерон ІФА (EIA-5298) та DRG Ренін ІФА в плазмі визначали наступні показники *Співвідношення Альдостерон-Ренін*:

Співвідношення Альдостерон-Ренін (пг/мл / пг/мл)

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

Результати аналізу не можуть бути єдиною причиною для терапевтичного висновку. Результат повинен корелювати з іншими клінічними дослідженнями і діагностичними тестами.

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контроль проводився з кожною калібрувальною кривою. Для визначення середніх значень та прийнятних діапазонів для забезпечення належної продуктивності необхідно провести аналіз статистично значущої кількості контролю.

Рекомендується використовувати контролю відповідно до державних і місцевих правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю як нормального рівня так і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті, відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають у встановлені границі матеріалів контролю, результати є не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.81 - 128 пг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Середнє значення перехресної реакції з Прореніном становить 0.71% (середнє значення при насиченні Прореніном в діапазоні концентрації від 256 до 4096 пг/мл). Проте спостережувана перехресна реактивність може лише являти собою контамінацію рекомбінантного препарату прореніну з активним реніном через автоактивацію.

Перехресна реактивність не була виявлена для сироваткового альбуміну людини, гамма-глобуліну людини, гепсидину людини та пепсину.

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість визначена як середнє за мінусом 2 стандартних відхилень (20 реплік) аналізу *Стандарту 0* і склала 0.81 пг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність в аналізі

Зразок	1	2	3
Середнє, пг/мл	9.12	26.98	43.99
КВ, %	8.73	3.88	4.24
К-сть =	20	20	20

9.4.2 Варіативність між аналізами

Зразок	1	2	3
Середнє, пг/мл	19.28	36.20	66.72
КВ, %	8.88	6.27	5.19
К-сть =	12	12	12

9.5 Відновлення

Зразки були насичені шляхом додавання розчинів Реніну з відомими концентраціями у співвідношенні 1:1.

Відновлення у % розраховується шляхом множення співвідношення вимірюваних та очікуваних величин на 100 (очікуване значення = (ендогенний Ренін + доданий Ренін)/2; через розбавлення сироватки 1:2 з матеріалом насичення).

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (пг/мл)	16.71	40.21	15.97
Середнє відновлення	92.92	95.09	96.00
Діапазон відновлення, %	від	85.99	87.93
	до	105.47	101.37

9.6 Лінійність

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (пг/мл)	45.16	53.20	126.0
Середнє відновлення	101.7	102.8	98.5
Діапазон відновлення, %	від	96.7	95.6
	до	108.6	114.6

10 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводитиметься з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Перехресно-діючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 1 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

10.2 Вплив лікарських засобів

Інгібітор Реніну аліскірен підвищить імунореактивність активного Реніну залежно від дози, від 0.54 мкМ (121%) до 540 мкМ (+ 151%).

Крім того, на рівень активного Реніну в плазмі може впливати антигіпертензивна терапія (наприклад, діуретики, інгібітори АПФ, бета-адренергічні блокуючі агенти або вазодилатори).

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні до 8200 пг/мл Реніну.

11 ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та

модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.
Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

