

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРРИТИНА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ

EIA-4408, Ferritin ELISA

Каталог. № : EIA-4408
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 02-2013
Версия 4.0



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

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный колориметрический метод для измерения концентрации ферритина в сыворотке или плазме человека. Набор предназначен только для лабораторного использования.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Анализ основан на одновременном связывании человеческого ферритина в двух моноклональных антител, одно иммобилизовано на планшете, а другое конъюгировано с пероксидазой хрена (HRP).

После инкубации связанное/свободное разделение осуществляется путем промывания.

После этого фермент, конъюгированный с HRP в связанной фракции, реагирует с субстратом (H₂O₂) и субстратом ТМВ, и развивается синий цвет, который изменяется на желтый, когда добавляется стоп раствор (H₂SO₄).

Интенсивность окраски пропорциональна концентрации ферритина в образце.

Концентрация ферритина в образце рассчитывается на основе стандартной кривой.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

3.1 Поставляемые в наборе реагенты и материалы

- Нулевой Стандарт Ферритина (1 флакон) 3 мл и Стандарты Ферритина (Стандарт 1-5), 5x (1 флаконов = 1 мл)
- Контроль Ферритина (1 флакон) 1 мл
Концентрация контроля зависит от серии и указана в листе контроля качества.
- Ферментный конъюгат (1 бутылка) 12 мл
Антитело анти-Ферритина, конъюгированное с пероксидазой хрена
- Микротитровальные лунки (1 делимый микропланшет)
Лунки покрыты антителом анти-Ферритина.
- Раствор субстрата (1 бутылка) 15 мл
H₂O₂-ТМВ 0.26 г/л. Избегать любого контакта с кожей.
- Стоп-раствор (1 бутылка) 15 мл
Серная кислота 0.15 моль/л. Избегать любого контакта с кожей.
- Промывочный раствор 20x (1 бутылка) 50 мл
NaCl 9 г/л; Tween-20 22 г/л

3.2 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор:

- Дистиллированная вода.

3.3 Вспомогательные материалы и оборудование

- Автоматический дозатор.
- Микропланшетный ридер (450 нм).

Примечание

Хранить все реагенты при 2-8°C в темном месте.

Вскрывать упаковку реагента 4 (покрытый микропланшет) только при достижении комнатной температуры и закрывать его сразу после использования.

После вскрытия микропланшет остается стабильным до истечения срока годности набора.

4 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Не для внутреннего или внешнего использования на людях или животных.
- Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты при работе с реагентами.

- Следуйте правилам надлежащей лабораторной практики (GLP) для обработки препаратов крови.
- Весь человеческий материал, используемый при подготовке реагентов, был проверен и признан отрицательным на антитела к ВИЧ 1 и 2, HbsAg и HCV. Ни один метод тестирования, однако, не может дать полной гарантии, что ВИЧ, ВГВ, ВГС или другие инфекционные агенты отсутствуют. Таким образом, Калибраторы и Контроли должны обрабатываться таким же образом, как и потенциально инфекционный материал.
- Некоторые реагенты содержат небольшое количество Проклина 300 в качестве консерванта. Избегайте контакта с кожей или слизистой оболочкой.
- ТМВ Субстрат содержит раздражитель, который может быть вреден при вдыхании, проглатывании или всасывается через кожу.
- Во избежание травмы, избегайте вдыхания, попадания внутрь или контакта с кожей и глазами.
- Стоп раствор состоит из разбавленного раствора серной кислоты. Серная кислота является ядовитым веществом и может быть токсичен при проглатывании. Для предотвращения химических ожогов, избегать контакта с кожей и глазами.
- Избегайте воздействия на реагент ТМВ/H₂O₂ прямых солнечных лучей, металлов или окислителей. Не замораживать раствор.
- Этот метод позволяет определить Ферритин от 5 до 1000 нг/мл.

5. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Пожалуйста, строго придерживайтесь последовательности пипетирования, предусмотренной в данном протоколе. Данные о производительности, представленные здесь, были получены с помощью специфических реагентов, перечисленных в настоящей Инструкции для пользования.
- Все реагенты должны храниться в холодильнике при температуре 2-8 °C в оригинальной упаковке. Любые исключения четко обозначены. Реагенты стабильны до истечения срока годности, при хранении и обращении, как указано.
- Привести все компоненты набора и образцы к комнатной температуре (22-28 °C) и хорошо перемешать перед применением.
- Не меняйте компоненты набора из разных партий. Срок годности, напечатанный на этикетках коробки и флаконов, должен быть соблюден. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
- При использовании автоматизированного оборудования, пользователь несет ответственность за то что набор был надлежащим образом проверен.
- Неполное или неточное удаление жидкости из лунок может повлиять на точность анализа и/или увеличить фон.
- Важно, чтоб время реакции в каждой лунке было стабильно результаты. Пипетирование проб не должно занимать более десяти минут, чтобы избежать смещения результатов теста. Если более 10 минут необходимо, следовать той же порядок устройства. Если используется более чем одна пластина, рекомендуется, чтобы повторить кривую в каждой пластине
- Добавление раствора ТМВ субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп-раствора. Поэтому субстрата ТМВ и Стоп-раствор должен быть добавлен в той же последовательности, чтобы исключить любое отклонение времени в течение реакции.
- соблюдать руководящие принципы для обеспечения контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа управления и/или объединенных сывороток.
- Максимальная точность необходима для восстановления и устройство реагентов.
- Образцы, микробиологически загрязненные, высоко липемические или гемолизированные, не должны использоваться в анализе.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не прикасайтесь к нижней части лунки.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Приготовление стандартов (S0-S5)

Стандарты готовы к использованию и откалиброваны относительно WHO 1st Ferritin 80/602 и имеют следующие концентрации:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
нг/мл	0	5	20	100	400	1000

Для образца с концентрацией, превышающей 1000 нг/мл, разбавить образец Нулевым Стандартом S₀.

После открытия стандарты стабильны 6 месяцев при 2-8 °C.

6.2 Подготовка Промывочного Раствора

Развести содержимое каждого флакона Концентрата Промывочного

раствора (20X) дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Для меньших объемов использовать разведение 1:20. Разбавленный Промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при температуре 2-8 °С.

6.3 Подготовка образца

Определение свободного Ферритина может быть выполнено на человеческой сыворотке или плазме.

Образец можно хранить при 2 - 8 °С в течение короткого времени (не более пяти дней).

Для более длительного хранения образцы должны быть заморожены при температуре - 20 °С.

Избегать повторного замораживания и оттаивания.

Контроль готов к использованию.

6.4 Процедура

1. Все реагенты привести к комнатной температуре (22-28 °С).
2. Неиспользованные стрипы должны быть надежно запечатаны в пакет из фольги, содержащий осушитель, и храниться при температуре 2-8 °С.
3. Во избежание микробного и/или химического загрязнения, неиспользованные реагенты не должны возвращаться обратно в оригинальные флаконы.
4. Так как необходимо выполнить определение в двух экземплярах, подготовить две лунки для каждой из пяти лунок калибровочной кривой (S0-S5), по две для каждого образца, две для контроля и одну для бланка.

Реагент	Стандарт	Образец/Контроль	Бланк
Образец/контроль		20 мкл	
Стандарт S0-S5	20 мкл		
Конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубировать при 22-28 °С в течение 1 часа. Удалить содержимое из каждой лунки; промыть лунки три раза 300 мкл разбавленного промывочного раствора.			
Раствор субстрата ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать при температуре 22-28 °С 10 минут в темном месте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Осторожно встряхнуть микропланшет. Считать абсорбцию (E) при 450 нм относительно бланка.			

7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли при нормальном, высоком и низком уровнях диапазона Ферритина для мониторинга процедуры анализа. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные, а значения определяются в каждой проведенной процедуре исследования. Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Средняя абсорбция

Вычислите среднюю абсорбцию (E_m) соответственно точкам стандартной кривой (S0-S5) и каждого образца.

Калибровочная кривая

Выведите значения стандартов (E_m) против концентрации. Экстраполируйте линию, которая проходит через точки. (напр., 4-параметрическая логистическая).

Вычисление результатов

Интерполируйте значения образцов на стандартной кривой для получения соответствующих значений концентрации, выраженных в нг/мл.

9. РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения Ферритина в сыворотке в пределе следующих диапазонов:

	Среднее нг/мл	Диапазон нг/мл
Мужчины	175	20 - 400
Женщины:		
Пременопауза	53	6 - 180
Постменопауза	105	8 - 350

Пожалуйста, обратите внимание на то, что определение диапазона ожидаемых значений для "нормального" населения в данном методе зависит от многих факторов, таких как специфичность и чувствительность используемого метода, категории населения, где проводится исследование. Поэтому каждая лаборатория должна рассматривать диапазон, рекомендуемый изготовителем, в качестве общего указания и установить свой собственный диапазон ожидаемых значений на основе коренного населения.

10. ПРОДУКТИВНОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

Вариация в анализе

Вариация в анализе была определена измерением репликата (16x) трех разных контрольных сывороток в одном анализе. Вариабельность в анализе составляет $\leq 5.4\%$.

Вариация между анализами

Вариация между анализами была определена измерениями репликатов (16X) трех разных контрольных сывороток из наборов различных партий. Вариабельность между анализами составила $\leq 6.1\%$.

10.2 Специфичность

Перекрестная реактивность антител рассчитана на основе соотношения вес/вес и приведена ниже:

Печень человека Iso - Ферритин	100 %
человека Iso - Ферритин	80 %
Сердце человека Iso - Ферритин	12 %

10.3 Достоверность

Восстановление 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 нг/мл Ферритина, добавленного к образцу, дало среднее значение (\pm SD) от 98.66 % \pm 2.90%.

10.4 Чувствительность

Самая низкая определяемая концентрация Ферритина, которую можно отличить от калибратора «0» составляет 0.53 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.5 Корреляция с РИА

Набор Ферритина был сравнен с имеющимся на рынке набором Ферритина РИА. Образцы сыворотки 22 женщин и 32 мужчин исследовались обеими системами анализа.

Линейная регрессия была определена следующим образом:

$$(EIA-4408) = 1.11 * (\text{Ферритин Диазорин}) - 10.46$$

$$r^2 = 0.972$$

10.6 Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается при значениях до 50,000 нг/мл.

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться с соблюдением местных требований.

12. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

13. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Возможные причины ошибок/Рекомендации по их устранению

Нет колориметрической реакции

- Отсутствие реакции после добавления конъюгата
- Загрязнение конъюгатов и/или субстрата
- Ошибки в проведении процедуры (например, ошибочное пипетирование реагентов в неверном порядке или не из того флакона, и т.п.)

Слишком слабая реакция (очень низкие OD)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Слишком короткое время инкубации, температура инкубации слишком низкая

Слишком сильная реакция (очень высокие OD)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Слишком длительное время инкубации, температура инкубации слишком высокая
- Низкое качество воды для промывочного буфера (низкий уровень деионизации)
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Непонятные результаты

- Загрязнение пипеток, наконечников или ёмкостей
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Слишком высокое значение CV % внутри анализа

- Реагенты и/или полоски не приведены к комнатной температуре перед использованием
- Промывочное устройство не работает надлежащим образом (совет: почистить головку для промывки)

Слишком высокое значение CV % между анализами

- Условия инкубации не постоянны (время, температура)

- Контроли и образцы не добавлялись с одинаковым промежутком времени (с одинаковыми интервалами) (проверить порядок пипетирования)
- Человеческий фактор



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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