



Набор ИФА для количественного определения ФЕРРИТИНА

Кат. № : KP33IW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 10-2007

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ является иммуноферментометрическим анализом для количественного определения ферритина в человеческой сыворотке.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это набор основан на методе иммуноферментометрического анализа (ИФМА). Используются двое различных моноклональных антител анти-ферритин, одно нанесено на лунки и другое конъюгированное с пероксидазой хрена. В течение первой инкубации ферритин, присутствующий в калибраторах и образцах, связывается сразу с обеими моноклональными антителами, формируя многослойный материал типа «сэндвич». После этой инкубации свободный материал удаляется циклом аспирации/промывания. Отаточная ферментная активность, обнаруживаемая в лунках, будет таким образом прямо пропорциональной концентрации ферритина в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМВ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм и 405 нм.

РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПОДГОТОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (мишинным) анти-ферритина. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой пакете тщательно закрытыми.
- **Калибраторы:** 1 флакон (2 мл) нулевого калибратора и 5 флаконов (1 мл) ферритина (печени человека) в PB и BSA следующих концентраций: 10, 50, 250, 750 и 2000 нг/мл. Консервант: тимеросал (<0.05%).
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (2,5 мл) моноклонального анти-ферритин антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) в Tris-HCl, BSA и стабилизаторами. Консервант: неомицин. Перед использованием добавьте 1,2 мл ферментного конъюгата во флакон разбавителя конъюгата (12 мл), или разбавьте конъюгат 1:11 разбавителем конъюгата исходя их необходимого для анализа объема, и осторожно перемешайте. Хранить разбавленный конъюгат при 2-8°C в течение месяца. При более длительном хранении заморозить при -20°C.
- **Разбавитель конъюгата:** 2 флакона (12 мл) Tris-HCl и BSA. Консервант: неомицин и тимеросал (<0.05%). Готовый к использованию.
- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов перерастворите раствор, поместив флакон на несколько минут в температуру 37°C. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Жидкий.
- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Жидкий.

Примечание: Чтобы получить раствор субстрата смешайте равные порции хромогена и субстратного буфера, используя чистый, тщательно очищенный флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течение 1 часа после подготовки.

- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
- **Самоклеющаяся пленка.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Ручной анализ

- Автоматические микропипетки на 10, 20, 100, 200, 300 и 1000 мкл со сменными наконечниками.
- Мерная колба.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 1200 об/мин.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
- Миллиметровочная графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте реагенты из различных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.

- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы в равных частях до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Образцы с концентрациями ферритина более чем 2000 нг/мл необходимо разбавить нулевым калибратором. Рекомендуется проводить разбавление в соотношении 1:5 (10 мкл образца + 40 мкл нулевого калибратора).

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
- 1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов и образцов.
- 2. Пипетируйте **20 мкл** каждого калибратора и образца в соответствующие лунки.
- 3. Добавьте **200 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка.
- 4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
- 5. Инкубируйте лунки в течении **60 мин. при КТ (18-25°C)** на орбитальном шейкере при 1200 об/мин.
- 6. Удалите пленку и осторожно аспирируйте инкубационную смесь из всех лунок.
- 7. Промойте лунки **4 раза 300 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 8. Пипетируйте **200 мкл** предварительного подготовленного раствора субстрата (см. раздел реагентов) в каждую лунку.
- 9. Инкубируйте **15 мин. при КТ (18-25°C)** на орбитальном шейкере при 1200 об/мин., избегайте прямого солнечного света.
- 10. Пипетируйте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 11. Считайте ОП желательно бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **20 минут** после завершения анализа. В случае выхода абсорбции из диапазона считайте ее при 405 нм.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 27 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при длине трех волн: 450, 405 и 620 нм, таким образом расширяя диапазон кривой.

Для получения лучшей чувствительности настоящий метод предусматривает спектрофотометрическое считывание при двух волнах (450 и 405 нм). Для образцов с концентрациями ферритина в диапазоне от 0 до 250 нг/мл, считывание проводите при 450 нм; для образцов с уровнями ферритина выше 250 нг/мл, считывайте при 405 нм.

Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибраторов (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации ферритина в нг/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочную кривую; в случае разбавленных образцов умножьте на коэффициент разбавления.

ПРИМЕР ВЫЧИСЛЕНИЯ

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных данных.

Описание (нг/мл)	Абсорбция при 450 нм	Ферритин	Абсорбция при 405 нм	Ферритин
Калибратор 0	0.007		0.002	
Калибратор 10	0.095		0.034	
Калибратор 50	0.412		0.143	
Калибратор 250	1.704		0.608	
Калибратор 750	> 3.000		1.207	
Калибратор 2000	> 3.000		1.770	
Образец 1	0.717	88 нг/мл	0.256	800 нг/мл
Образец 2	> 3.000		1.280	

Значения нормы

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы.

Здоровые мужчины:	17 - 430 нг/мл
Женщины:	
перед менопаузой	10 - 120 нг/мл
в менопаузе	10 - 180 нг/мл

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Специфичность

В настоящем методе не было обнаружено перекрестной реактивности.

Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение + 2 СО). Эта доза составляет **2,0 нг/мл**.

Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабильность внутри и между анализами) 4 сывороток при разных концентрациях ферритина.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	15.4	0.53	3.4	10
B	52.1	1.9	3.8	10
C	535.0	12.6	2.3	10
D	1890.0	27.0	1.4	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	15	0.6	4.0	10
B	52	3.0	5.7	10
C	541	33.0	6.1	10
D	1918	52.5	2.7	10

Соответствие

Проверена при использовании анализов на восстановление и параллелизм.

Испытание на восстановление

Известные количества ферритина были добавлены к сыворотке нормы и проанализированы.

Добавлено (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)	Восстановление %
S1	---	40.7	----
S1 + 800	840.7	880	104.6
S1 + 400	440.7	480	108.9
S1 + 200	240.7	250	103.8
S1 + 100	140.7	137	102.7
S1 + 50	90.7	98	108.0

Испытание на параллелизм

Сыворотка с высокой концентрацией ферритина была проверена нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)
S1 неразбавл.	---	1600
1:2	800	800
1:4	400	420
1:8	200	200
1:16	100	100
1:32	50	50
1:64	25	26
1:128	12.5	13

«Хук-эффект»

Всякий раз, когда образцы с очень высокими концентрациями антигена анализируются неразбавленными в двухэтапном «сэндвич»-методе, как в этом наборе, "хук-эффект" может дать значения концентраций явно ниже чем фактические значения. Этот набор не дает "хук-эффекта" при концентрации до 10 000 нг/мл.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 ул. Чорновола, 97,
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: (0342) 77 51 22;
 тел./факс: (0342) 77 56 12
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua