

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФЕРРИТИНА В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

1601-16, Ferritin

Каталог. № : 1601-16
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 04-08-2015



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

Только для диагностического использования *in vitro*

Анализ	Ferritin ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-800 нг/мл
Образец	20 мкл сыворотки
Специфичность	98.5 %
Чувствительность	5.0 нг/мл
Общее время	~ 80 минут
Срок годности	12 месяцев от даты производства

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации человеческого ферритина в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных заболеваний у людей является диетический дефицит железа и в следствии анемия. Поэтому, анализ железа, общей связывающей способности железа является клинически важным

Основными компонентами, что содержат железо, являются гемоглобин, гемосидерин, миоглобин и цитохромы. В большинстве тканей, ферритин является основным железо-сохраняющим протеином. Человеческий ферритин имеет молекулярный вес приблизительно 450000 дальтон и состоит из протеиновой оболочки вокруг ядра железа; каждая молекула ферритина может содержать 4000 атомов железа. При нормальных условиях, он представляет 20% общего железа в теле человека. К тому же ферритин может иметь несколько изомеров.

Высокая концентрация ферритина обнаружена в цитоплазме ретикулоэндотелиальной системы, печени, селезенке и костном мозге. Методы, что использовались для измерения железа в этих тканях, были инвазивные и приводили к травмам пациента и потери необходимой чувствительности.

Измерение ферритина в сыворотке используется в определении изменения в теле хранения железа и является неинвазивным при низком дискомфорте пациента. Уровень ферритина в сыворотке может измеряться вручную и частично используется при раннем определении железодефицитной анемии в очевидно здоровых людей.

Измерение ферритина в сыворотке является также важным при мониторинге статуса железа у беременных женщин, доноров крови и у пациентов с гемодиализом. Высокий уровень ферритина может указывать на перенасыщенность железа без видимых повреждений печени, а также при ранних стадиях идиопатического гемохроматозиса. Уровни ферритина в сыворотке также используются для оценки клинических условий, не связанных с содержанием железа, как воспаление, хронические заболевания печени и опухоли.

Данный тест предлагает быстрый, чувствительный и надежный анализ. Антитела, развитые для этого теста определяют минимальную концентрацию человеческого ферритина – 5 нг/мл. Минимальная перекрестная реактивность с альбумином человеческой сыворотки, альфа-фетопротеином, гемоглобином, трансферрином и хлорида железа.

ПРИНЦИП

Этот набор основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа. В нем используется анти-ферритин

антитело для иммобилизации солидной фазы (микропланшетные лунки) и другое мышинное моноклональное анти-ферритин антитело в растворе конъюгата антитело-энзим (пероксидаза хрена). Тестовый образец дает возможность одновременно реагировать с антителами, в результате молекулы ферритина будут в сэндвиче твердой фазой и энзимно-связанными антителами. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре лунки промываются водой для удаления несвязанных меченных антител. Добавляется раствор ТМБ и инкубируется 20 минут, в результате происходит развитие голубого окраса. Развитие окраса останавливается добавлением стоп раствора и окрас изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация ферритина прямо пропорциональна интенсивности окраса тестового образца.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотку необходимо приготовить из образцов цельной крови, полученных приемлемой медицинской технологией. Этот набор предназначен для образцов сыворотки без добавок.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора:

1. Планшет с лунками, покрытыми антителом, 96 лунок в пакете.
2. Набор референтных стандартов 0; 10; 50, 100, 400 и 800 нг/мл, готовы к использованию.
3. Реагент ферментного конъюгата, 12 мл
4. Субстрат ТМБ, 12 мл
5. Стоп-раствор, 12 мл.
6. Концентрат промывочного буфера (50x), 15 мл.

Требуемые, но не поставляемые материалы:

1. Точные пипетки: 5-40 мкл и 0,05-0,2 мл.
2. Одноразовые наконечники для пипеток.
3. Дистиллированная вода.
4. Вихревой смеситель (вортекс) или аналог.
5. Промокательная бумага или бумажное полотенце.
6. Бумага для построения графиков.
7. Микропланшетный луночный считыватель.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием доведите реагенты до комнатной температуры (18-22 °C).
2. Разбавьте 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разбавьте 15 мл концентрата промывочного буфера (50x) в дистиллированной воде, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешайте.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Поместите нужное количество лунок в рамку для стрипов.
2. Внесите 20 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания на этом этапе.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (18-25 °C) 60 минут.
6. Удалите инкубационный раствор, вытряхнув содержимое планшета в контейнер для отходов.
7. Промойте и опустошите микролунки 5 раз промывочным буфером (1x).
8. Резко переверните лунки на промокательную бумагу для удаления оставшихся капель воды.
9. Внесите 100 мкл ТМБ субстрата в каждую лунку. Осторожно перемешайте 5 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре 20 минут в темноте.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора в каждую лунку.
12. Осторожно перемешайте 30 секунд. **Важно убедиться, что голубой окрас изменился полностью на желтый.**
13. Считайте оптическую плотность при 450 нм микропланшетным считывателем в течении 30 минут.

Важные замечания:

1. Процедура промывания крайне важна. Недостаточное промывание приведет к завышенной абсорбции и неточным результатам.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

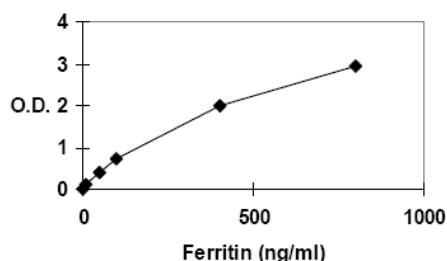
Определите среднюю абсорбцию для каждого набора стандартов, контролей и образцов. Постройте стандартную кривую, откладывая точки средней абсорбции стандартов на вертикальную ось Y, против соответствующих концентраций на горизонтальную ось X. Используйте среднее значение поглощения для каждого образца, чтобы определить соответствующее значение концентрации

ферритина в нг/мл из стандартной кривой. Разбавленные образцы должны быть скорректированы на фактор разбавления.

Пример построения калибровочной кривой

Результаты получают со считыванием оптической плотности при 450 нм на оси Y по отношению к концентрациям ферритина на оси X. Пример построения калибровочной кривой приведен только в качестве иллюстрации. Ее нельзя использовать для расчета неизвестных значений. Каждый пользователь должен получить свои собственные данные и калибровочную кривую.

Ферритин (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0,0	0,003
10	0,093
50	0,401
100	0,714
400	1,995
800	2,963



Ожидаемые значения и чувствительность

Рекомендуется, чтоб каждая лаборатория определяла собственные нормальные границы, принимая во внимание такие факторы окружающей среды, как диета, климат и т.д. Результаты, представленные ниже, базируются на ограниченном числе образцов крови здоровых взрослых пациентов. Минимальная чувствительность теста равна 5,0 нг/мл.

	Мужчины	Женщины
Число	80	90
Среднее (нг/мл)	170,0	71,0
Среднее (нг/мл)	32,0-501,0	3,5-223,5

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Достоверность: сравнение между нашим тестом и коммерчески доступным тестом предоставило следующие данные:

N = 115
 Коэффициент корреляции = 0.990
 Наклон = 0.817
 Пересечение = -3.74
 Среднее (наши наборы) = 195.1
 Среднее (Bio-Rad) = 243.4

II. Точность:

1) Внутрисерийная:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	326.28	15.20	4.66
Уровень 2	20	189.08	10.41	5.51
Уровень 3	20	26.52	1.72	6.49

2) Между сериями:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	332.83	20.46	6.15
Уровень 2	20	192.18	14.33	7.46
Уровень 3	20	24.24	3.58	14.73

III. Линейность:

Две сыворотки пациента с серийно развелили Стандартом 0 Ед/мл в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 101.0 %.

Образец А			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	186.94	186.94	
2X	93.47	94.16	100.7
4X	46.74	48.76	104.3
8X	23.37	24.53	105.0
16X	11.69	12.34	105.6
32X	5.85	5.87	100.3
Среднее восстановление: 103.2 %			

Образец В

Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	146.25	146.25	
2X	73.13	76.51	104.6
4X	36.57	37.50	102.5
8X	18.29	18.01	98.5
16X	9.15	12.34	95.5
32X	4.58	4.27	93.2
Среднее восстановление: 98.7 %			

IV. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известным уровнем пролактина смешивались и анализировались в дубликатах. Среднее восстановление составило 98.1 %.

Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
5.07	5.05	99.6
9.30	8.79	94.5
21.27	20.11	94.5
43.13	48.03	89.7
85.34	90.00	105.5
166.60	174.06	104.4
Среднее восстановление: 98.1 %		

V. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 5.0 нг/мл.

VI. Перекрестная реактивность

Следующие антигены маркеров рака в высоких концентрациях были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Concentration	Equivalent Ferritin
Human Serum Albumin	10.0 g/dl	0.0 ng/ml
Human AFP	8,000 ng/ml	0.0 ng/ml
Ferric Chloride	100.0 mg/dl	0.0 ng/ml
Human Transferrin	100.0 mg/dl	0.0 ng/ml
Human Hemoglobin	500.0 mg/dl	0.0 ng/ml

VII. Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался при концентрациях 12.000 нг/мл Ферритина.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Не вскрытые наборы после получения следует хранить при 2-8 °С, а планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем. Чтобы минимизировать попадание влажного воздуха. Набор анализа может использоваться в течении срока годности (Один год от даты производства). Срок годности указан на этикетке упаковки. Вскрытые наборы остаются стабильными до окончания срока пригодности при хранении согласно инструкции. Подходящим является микропланшетный считыватель с шириной дорожки 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.



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