



## Набор ИФА для определения ЛЕПТИНА

Кат. № : EIA-2395  
Количество : 96  
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 05-2009  
Версия 7.0

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

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения лептина в сыворотке и плазме крови. Этот анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro*.

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Лептин ELISA является твердо фазовым энзимосвязанным иммуносorbентным анализом (ELISA), что базируется на принципе сэндвича. Микропланшетные ячейки покрыты моноклональным анти-лептин антителом. Аликвот сыворотки пациента, содержащий эндогенный лептин, инкубируется в лунках, покрытых специфическим кроличьим анти-лептин антителом. Формируется комплекс сэндвича. После инкубации несвязанный материал вымывается и конъюгат анти-кроличьей пероксидазы добавляется для определения связанного лептина. После добавления раствора субстрата, интенсивность окраса, что развилось, пропорциональна концентрации лептина в образце пациента.

### 3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/26 поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и

подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.

- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

### 4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

#### 4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (делимые) полоски, 96; лунки покрыты мышинным анти-лептинным антителом (моноклональным).
2. **Стандарт (стандарт 0-5)**, 6 флаконов, 0,5 мл, готовые к использованию; Концентрации: 0, 2, 5, 25, 50 и 100 нг/мл. Содержат 0.3% проклина в качестве консерванта.
3. **Контроль (низкий и высокий)**, 2 флакона, 0,5 мл, готовый к использованию; 2 уровня (низкий и высокий). Значение и диапазоны контроля указаны на этикетке флакона или листе данных контроля качества. Содержат 0.3% проклина в качестве консерванта.
4. **Рабочий буфер**, 1 флакон, 11 мл, готовый к использованию. Содержат 0.3% проклина в качестве консерванта.
5. **Антисыворотка**, 1 флакон, 11 мл, готовая к использованию поликлональная сыворотка лептина. Содержат 0.3% проклина в качестве консерванта.
6. **Ферментный комплекс**, 1 флакон, 11 мл, готов к использованию. Анти-кроличий комплекс, конъюгированный с пероксидазой хрена. Содержат 0.3% проклина в качестве консерванта..
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готовый к использованию TMB.
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готовый к использованию, содержит 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

*Избегайте контакта со стоп раствором. От может вызвать раздражения кожи и ожоги.*

9. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл (концентрация 40x). См. „Подготовка реагентов“.

**Примечание:** дополнительный 0 стандарт для разведения образца доступен по запросу.

#### 4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшеточный откалиброванный ридер (450/620nm +/- 10nm).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная вода.
- Таймер.
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

#### 4.3 Условия хранения

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать. Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть.

#### 4.4 Подготовка реагентов

**Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.**

##### Стандарты

Перерастворить содержимое лиофилизата флаконов стандарта 0,5 мл дистиллированной, оставить минимум на 10 мин. Перед использованием смешать флаконы несколько раз.

*Примечание: перерастворенные стандарты стабильны по крайней мере 6 недель при 2-8°C.*

*При более длительном хранении заморозить при - 20°C.*

##### Контроль

Перерастворить содержимое лиофилизата каждого флакона 0,5 мл дистиллированной, оставить минимум на 10 мин. Перед использованием смешать контроль несколько раз.

Примечание: перерастворенный контроль стабильный по крайней мере 6 недель при 2-8°C.

При более длительном хранении заморозить при -20°C.

#### Промывочный раствор

К 40х концентрированному промывочному раствору добавить деионизированной воды.

Разбавить 30 мл концентрированного промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 2 недель при комнатной температуре.

#### 4.5 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной инструкции).

#### 4.6 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

#### 5. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка или плазма. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Примечание: Образцы, содержащие азид натрия в анализе не должны использоваться.

Не предусматривается особого обращения с образцами мочи.

#### 5.1 Сбор образцов

##### Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. Пациентам, проходящим терапию антикоагулянтами может потребоваться больше времени для свертывания.

##### Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и центрифугировать после забора.

(Например, для плазмы ЭДТА - Sarstedt Monovette – красная крышка - # 02.166.001; для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette – оранжевая крышка - # 02.165.001; для цитратной плазмы - Sarstedt Monovette – зеленая крышка - # 02.167.001).

#### 5.2 Хранение образцов

Перед анализом образцы должны храниться закрытыми и могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Размороженные образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

#### 5.3 Разбавление образцов

Если в первом анализе образцы с начальными значениями вышими, чем наивысший стандарт, необходимо разбавить их 0 стандартом и повторно проанализировать как описано в «Процедуре анализа». Для вычисления концентрации необходимо учесть коэффициент разбавления:

Пример:

а) Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);

б) Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте).

#### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

##### 6.1 Общие замечания

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.

- После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
- В основном энзимная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

#### 6.2 Процедура анализа

1. Закрепите нужное количество микротитровальных лунок в держателе.
2. Внесите в соответствующие лунки по **15 мкл** каждого стандарта, контроля и образца, **используя новые наконечники**.
3. Внесите в каждую лунку по **100 мкл** рабочего буфера. Тщательно перемешайте в течении 10 сек. В данном этапе важно провести полное смешивание.
4. Инкубируйте **120 минут** при комнатной температуре (не накрывая планшет).
5. Резко вытряхните содержимое лунок. Промойте лунки **3 раза** разбавленным промывочным раствором (**300 мкл** на лунку). Резко постучите планшетом над промокающей бумагой, чтобы удалить остатки влаги. **Важное замечание:** Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Добавьте в каждую лунку по **100 мкл** антисыворотки.
7. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
8. Резко вытряхните содержимое лунок. Промойте лунки **3 раза** разбавленным промывочным раствором (**300 мкл** на лунку). Резко постучите планшетом над промокающей бумагой, чтобы удалить остатки влаги.
9. Добавьте в каждую лунку по **100 мкл** ферментного комплекса.
10. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
11. Резко вытряхните содержимое лунок. Промойте лунки **3 раза** разбавленным промывочным раствором (**300 мкл** на лунку). Резко постучите планшетом над промокающей бумагой, чтобы удалить остатки влаги.
12. Добавьте в каждую лунку по **100 мкл** раствора субстрата.
13. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
14. Остановите ферментативную реакцию путем добавления **50 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
15. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

#### 6.3 Определение результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси У и концентрации на оси Х.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой. Могут использоваться другие методы обработки данных в зависимости от опыта и компьютерной программы.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплин, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить нулевым стандартом. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

##### 6.3.1 Пример типичной калибровочной кривой

Стандарт	ОП
Стандарт 0 (0 нг/мл)	0,08
Стандарт 1 (2 нг/мл)	0,25
Стандарт 2 (5 нг/мл)	0,50
Стандарт 3 (25 нг/мл)	1,31
Стандарт 4 (50 нг/мл)	1,67
Стандарт 50 (100 нг/мл)	1,93

#### 7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, что каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

При обследовании явно здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие значения:

Популяция	нг/мл
Женщины	3,84 ± 1,79
Мужчины	7,36 ± 3,73

## 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

## 9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0-100 нг/мл

### 9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие вещества проверялись на перекрестную реактивность анализа:

Компонент	Перекрестная реактивность
Человеческий лептин	100 %
Крысиный лептин	<0.2 %
Мышиный лептин	<0.2 %
Человеческий инсулин	Н.О.
Человеческий проинсулин	Н.О.
Крысиный инсулин	Н.О.
Человеческий С-пептид	Н.О.
Глюкагон	Н.О.
IGF-I	Н.О.

Н.О. – вне определения

### 9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена из среднего плюс двух стандартных отклонений 20 репликантов анализа 0 стандарта и составила 1,0 нг/мл.

### 9.4 Точность

#### 9.4.1 Вариативность в пределах анализа

Образец	К-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	10	3,15	5,95
2	10	24,62	6,91

#### 9.4.2 Вариативность между анализами

Образец	К-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	12	2,71	11,55
2	12	26,15	8,66

## 10. ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Неправильное обращение с образцами или изменение процедуры может влиять на результаты.

### 10.1 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

## 11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

### 11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и

законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

### 11.2 Терапевтические заключения

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

### 11.3 ответственность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора. Любые повреждения при транспортировке набора не являются под ответственностью производителя.

## 11. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

