

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛЮДСЬКОГО РЕЗИСТИНУ

E50, Resistin ELISA

Каталог. №: **E50**

Методика від 03-01-2013

Кількість : **96**

Версія **6**

Виробник : **Mediagnost (Німеччина)**



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

Mediagnost Резистин ІФА E50 -

- **Тільки для використання в дослідницьких цілях!**
- Підходить для визначення Резистину в зразках **Сироватки і Плазми**
- Надзвичайно чутливий (**12 пг/мл \approx 1.2 пг на лунку**), що дозволяє проводити вимірювання також і в середовищі клітинних культур, і у взірцях, які не є сироваткою, наприклад, СМР, Амніотична рідина, Слина, сеча, Грудне молоко
- **Швидкий:** інкубаційний період в цілому складає 4 години
- **Одиночні Стандарти з 20, 100, 300, 600, 1000 пг/мл людського Резистину** надаються в наборі
- 2 Контрольні сироватки надаються з метою контролю якості
- Калібровані з рекомбінантним **Резистином**
- Мікротитраційний планшет зі стрічками, що відокремлюються; тести можуть бути адаптовані згідно з індивідуальними вимогами

ПРИЗНАЧЕННЯ

Вимірювання людського Резистину в зразках сироватки та плазми людини.

ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

Реагенти, що постачаються

1)	Мікропланшет, готовий до використання: Мікропланшет з 96 лунками, розділеними на 12 смужок з 8 лунками кожна, які відокремлюються, покритих людським антитілом Резистину.
2)	Стандарти А-Е, ліофілізовані, містять рекомбінантний Резистин. Стандартні значення між 0.02 - 1 нг/мл (20, 100, 300, 600 і 1000 пг/мл) Резистину і повинні бути відновлені в 750 мкл (кожен) в Буфері для зразків РР. Увага: Використовуйте тільки Буфер для зразків РР для цього розведення; тільки це забезпечить інкубацію Стандартів і зразків в однакових умовах в тому ж самому спеціальному буфері!
3)	Буфер для зразків РР, 120 мл, готовий до використання; будь ласка, використовуйте для відновлення Стандартів А-Е, Контрольних Сироваток KS1 і KS2 та для розведення зразків.
4)	Буфер для розведення VP, 25 мл, готовий до використання; будь ласка, використовуйте для відновлення Контрольних Сироваток KS1/KS2 та для розведення Кон'югату Антитіл АК і Ферментного Кон'югату ЕК.
5)	Контрольна сироватка KS1&KS2, ліофілізована: Містить сироватку людини і має бути відновлена в 250 мкл (кожна) Буфера для розведення VP. Концентрації цільових значень Резистину і відповідні діапазони наведені на етикетках флаконів з реагентами. Розбавлення Контрольних Сироваток KS1&KS2 у Буфері для зразків РР повинно бути виконано у відповідності до розведення зразків.
6)	Кон'югат Антитіл АК, 120 мкл, 100X концентрований розчин, містить суміш біотинильованих антитіл до анти-Резистину та HRP (Пероксидаза хрому). Розвести перед використанням 1:100 в Буфері для Розведення VP: наприклад, додати 100 мкл Кон'югату Антитіл АК до 10 мл Буфера для Розведення VP, перемішати і використовувати 100 мкл/лунку в аналізі.
7)	Ферментний Кон'югат ЕК, 120 мкл, 100X концентрований розчин, містить Стрептавідин, мічений HRP (Пероксидаза хрому). Розвести перед використанням 1:100 в Буфері для Розведення VP: наприклад, додати 100 мкл Ферментного Кон'югату ЕК до 10 мл Буфера для Розведення VP, перемішати і використовувати 100 мкл/лунку в аналізі.
8)	Промивний Буфер (WP), 50 мл, 20-кратний концентрований розчин. Промивний Буфер (WP) повинен бути розведений 1:20 дистильованою або демінералізованою водою перед використанням (наприклад, додати весь вміст колби (50 мл) в мірну колбу і залити дист. водою до 1000 мл). Увага: Після розведення Промивний Буфер є стабільним тільки на протязі 4 тижнів при зберіганні при 2-8 °С, розвести тільки необхідну кількість.
9)	Субстрат (S), 12 мл, готовий до використання, субстрат пероксидази хрому (HRP), стабілізований Н ₂ О ₂ Тетраметилбензидином.
10)	Стоп-розчин (SL), 12 мл, готовий до використання, 0.2 М сірчана кислота.

	Увага, кислоти!
11)	Ущільнювальна стрічка для покриття поверхні лунок планшета, 3 штуки; така, що клеїться.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ НАДАЮТЬСЯ

Точні піпетки і багатоканальні піпетки зі змінними пластиковими наконечниками
Мірна колба для розведення Промивного буфера (WP)
Дистильована або деіонізована вода для розведення Промивного Буфера (WP), 950 мл
Вортексний міксер
Мікропланшетний Шейкер (350 об/хвилину)
Мікропланшетний Вошер (рекомендується)
Мікропланшетний Рідер ("ІФА-рідер") з фільтром на 450 і \geq 590 нм
Поліетиленові ПЕ/Поліпропіленові ПП пробірки для розведення зразків

ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Тільки для діагностики в лабораторних умовах. Тільки для професійного використання.

Перед початком аналізу прочитайте інструкцію повністю й уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції, вкладеної в упаковку, що постачається в комплекті. Переконайтеся, що все зрозуміло. Перед використанням усі компоненти набору повинні бути доведені до кімнатної температури при 20-25 °С. Осади в буферах необхідно розчинити перед використанням ретельним перемішуванням і нагріванням. Температура впливає на значення щільностей. Тим не менше, це не вплине на значення для зразків.

Реагенти з наборів з іншими серійними номерами не слід змішувати. Не використовуйте прострочені реагенти.

Знищення вмісту контейнерів та невикористаних реагентів повинно відбуватися відповідно до встановлених вимог.

Не використовувати пошкоджений матеріал, або забруднений мікробами.

Увага: Цей набір містить матеріали людського та/або тваринного походження. Джерела сироваток людини були протестовані рекомендованими FDA методами і виявили відсутність реакції на поверхневий антиген до Гепатиту В (HBsAg), на антитіла до Вірусу гепатиту С (HCV), і Вірусу імунодефіциту людини 1 і 2 (ВІЛ).

Жоден з відомих методів випробувань не може запропонувати повну впевненість у відсутності інфекційних агентів, тому всі компоненти і зразки пацієнта повинні розглядатися як потенційно інфіковані.

2-Метил-4-Ізотіазолін-3-один

Наступні компоненти містять <0.01% Розчину 2-Метил-4-Ізотіазолін-3-один в якості консерванту: А-Е, АК, VP, РР

- R36/38 Подразнює очі і шкіру
- R43 Можливість сенсibiлізації через контакт зі шкірою
- S26 У випадку потрапляння в очі негайно промити великою кількістю води і звернутися до лікаря
- S28.1 При контакті з шкірою негайно промити великою кількістю води

5-хлор-2-метил 2Н ізотіазол-3-один і 2-метил-2Н-ізотіазол-3-один
Наступні компоненти містять <0.01% Розчину 5-хлор-2-метил 2Н ізотіазол-3-один і 2-метил-2Н-ізотіазол-3-один в якості консерванту: А-Е, АК, VP, WP, РР

- R36/38 Подразнює очі і шкіру
- R43 Можливість сенсibiлізації через контакт зі шкірою
- S26 У випадку потрапляння в очі негайно промити великою кількістю води і звернутися до лікаря
- S28.1 При контакті з шкірою негайно промити великою кількістю води

Стоп розчин містить 0.2 М Сірчаної Кислоти (H₂SO₄)

- R36/38 Подразнює очі і шкіру
- S26 У випадку потрапляння в очі негайно промити великою кількістю води і звернутися до лікаря
- S28.1 При контакті зі шкірою негайно промити великою кількістю води
- S36/37 Використовувати захисний одяг і рукавички

Піпетування зразків і реагентів має бути зроблено якомога швидше і в тій же послідовності для кожного кроку. Використовуйте окремі наконечники для кожного зразка, контролю та реагенту, щоб уникнути перекресного забруднення. Використовуйте резервуари тільки для окремих реагентів. Це особливо відноситься до резервуарів субстратів. Використання резервуару для піпетування розчину субстрату, який раніше був використаний для Розчину Кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не лийте реагенти назад у флакони, де може відбутися забруднення реагенту. Змішайте вміст лунок ретельно для забезпечення хороших

результатів випробувань. Не використовуйте повторно лунки. Не дозволяйте лункам висохнути протягом аналізу, додавати реагенти негайно після закінчення кроку промивки.

TMB-Субстрат (S) містить 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин.

Зберігати та інкубувати в темноті.

R20/21/R22	Шкідливий при вдиханні, при контакті зі шкірою і при ковтанні
R36/37/38	Дратує очі, дихальні органи і шкіру
S26	У випадку потрапляння в очі негайно промити великою кількістю води і звернутися до лікаря
S28.1	При контакті з шкірою негайно промити великою кількістю води
S36/37	Використовувати захисний одяг і рукавички

Загальні заходи швидкої допомоги:

Контакт зі шкірою: Промити уражену ділянку водою. Позбутися забрудненого одягу і взуття.

Попадання в очі: У разі попадання в очі негайно промити великою кількістю води протягом 15 хвилин.

З метою забезпечення дієвого полоскання розкрити очі.

Попадання всередину: Проковтнувши прополоскати рот ретельно з водою. Відразу звернутися до лікаря.

Не їсти, не пити і не палити в зоні роботи.

Ніколи не піпетувати ротом.

Пролитий матеріал повинен бути стертий відразу і повинен бути дезінфікований. Очистити забруднені області та обладнання за допомогою відповідного миючого засобу.

Метод

Mediagnost ELISA для визначення Резистину E50 є так званим сендвіч-аналізом. Він використовує специфічні високої спорідненості поліклональні антисироватки кролика, нанесені в лунки планшета для мікротитрування. Резистин в зразках зв'язується кількісно з іммобілізованими антисироватками. На наступному етапі, біотинільована сироватка зв'язується в свою чергу з Резистином. Після промивання буде додано стрептавідин-пероксидаза-ферментний кон'югат, який зв'язується з високою специфічністю з біотином антисироватки і каталізує в реакції зупинки зміну кольору, яка кількісно залежить від рівня Резистину в зразках.

Зразки

Можуть використовуватись зразки сироватки і плазми (значне відхилення рівнів Резистину у відповідних зразках сироватки, гепарин-, ЕДТА-, цитрат- плазми не спостерігалось). Гемолізовані зразки показують хибно високі рівні Резистину; не рекомендується використання таких зразків. Культуральна сироватка, слина, грудне молоко і сеча були визнані придатними в якості зразків також. Завдяки спеціальному буферу для зразків зовнішня пробопідготовка перед аналізом не потрібна (див. нижче).

Зразки крові для приготування сироватки повинні бути отримані відповідно до стандартизованої процедури венепункції. Зразки повинні зберігатися без антикоагулянтів. Уникати гемолітичних реакцій. Кров повинна згорнутися і після повного згортання сироватку відокремлюють центрифугуванням.

Зберігання зразків

Зберігання при КТ макс. 2 дні
Зберігання при температурі -20 °C макс. 2 роки

В пластмасових пробірках, які щільно закриваються. Зберігання зразків понад 2 роки при -20 °C не вплинуло на вимірне значення.

Слід звести до мінімуму цикли заморожування/відтавання зразків.

Підготовка зразків

Зразки мають бути розведені в Буфері для Розведення (PP). Відмінна лінійність цієї тестової системи дозволяє розведення зразків від 1:5 до 1:400.

У більшості визначень (зразки сироватки або плазми, і ніяких екстремальних значень не очікується) розведення **від 1:10 до 1:50 Буфером для зразка PP** повинні бути придатні. Відповідно до очікуваних рівнів Резистину розбавлення PP може бути вище або нижче. Оскільки Буфер для зразків PP спеціально розроблений для правильного визначення Резистину, розбавлення має бути **не менше 1: 5!**

Концентрації Резистину можуть повністю відрізнитися в рідинах організму людського походження, крім сироватки або надосадової рідини культури клітин.

Для клінічних цілей ми рекомендуємо стандартне розбавлення 1:21.

Рекомендації щодо розбавлення:

Піпетувати 300 мкл Буфера для Зразків PP в ПЕ/ПП-пробірці (застосування мульти-степпера рекомендується для великої серії), додати 15 мкл Сироватки або Плазми (розведення: 1:21). Після змішування використати **2 × 100 мкл** з цього розведеного зразка для аналізу.

ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ І ТЕХНІЧНІ ПРИМІТКИ

Аналіз повинен проводитися суворо з дотриманням протоколу випробування.

Реагенти з різних серій не можуть бути змішані.

Мікропланшет і реагенти стабільні до зазначеного терміну, якщо зберігаються в закритому і захищеному від сонячних променів місці при 2 - 8 °C.

Термін зберігання компонентів після першого відкриття обмежується до **4 тижнів**, якщо вони зберігаються відповідно.

Перед використанням привести всі реагенти до кімнатної температури (**20-25 °C**). Можливі опади в буферах необхідно розчинити перед використанням шляхом змішування та/або нагрівання.

Інкубація при кімнатній температурі означає: 20-25 °C.

Етапи інкубації слід проводити при середній частоті обертання на найкраще підходящому мікропланшетному шейкері. Ми рекомендуємо 350 об/хвилину. У зв'язку з певними технічними відмінностями можливі відхилення, у випадку, якщо частота обертання повинна бути відрегульована. Недостатнє струшування може привести до неадекватного перемішування розчинів і тим самим, до низьких оптичних густин, високих варіацій і/або помилкових значень; надмірне струшування може стати причиною високих оптичних густин та/або помилкових значень.

Правильне промивання має принципове значення для безпечного, надійного та точного виконання тесту. Неповне промивання є частою помилкою і негативно позначається на тестовому результаті. Можливими наслідками можуть бути не контрольовані неспецифічні варіації вимірюваних оптичних густин, що може призвести до помилкових результатів розрахунків досліджених зразків. Ефекти, такі як високі фонові значення або високі варіації, можуть вказувати на проблеми промивання.

Всі промивання повинні виконуватися за допомогою доданого промивального буфера, розведеного до концентрації використання. Обсяг на цикл промивки та на лунку має бути 300 мкл, щонайменше. Небезпека в роботі з потенційно інфекційним матеріалом повинна бути прийнята до уваги.

При використанні автоматичного мікропланшетного вошера, відповідні інструкції щодо використання мають бути дотримані. Повинні бути виконані налаштування пристроїв, наприклад, геометрія пластини і наданих параметрів промивання. Колектор для зомтування та аспірації не повинен дряпати поверхню всередині лунки. Розрахунки повинні бути зроблені таким чином, щоб обсяг залишкової рідини кожного кроку аспірації зводився до мінімуму. Після останнього кроку аспірації кожного циклу промивки, це можна контролювати, і можливий залишок рідини може бути видалений, перевертанням планшета і неодноразовим постукуванням ним по сухому фільтрувальному паперу.

Ручне промивання є адекватним альтернативним варіантом. Промивний Буфер може бути розподілений через мультикроковий пристрій, за допомогою багатоканальної піпетки, або пульверизатор. Рідина може бути вилучена шляхом динамічного витрушування з планшета в раковину. Якщо використовуються аспіраційні пристрої, переконайтеся, що поверхня всередині лунки не дряпається. Після кожного кроку промивання можливий залишок рідини може бути видалений перевертанням планшета і неодноразовим постукуванням ним по сухому фільтрувальному паперу.

Стандарти і Контролі

Для відновлення ліофілізованих **Стандартів А-Е Буфер для зразків PP** повинен бути використаний.

Ліофілізовані **Контрольні сироватки KS1 і KS2** повинні бути відновлені з **Буфером для розведення VP**.

Розбавлення **Контрольних Сироваток в Буфері для зразків PP** слід проводити відповідно розбавленню зразків.

Рекомендується тримати відновлені реагенти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім змішати їх ретельно, але обережно (без утворення піни) за допомогою Вортекса.

Відновлені стандарт і контролі можна зберігати протягом **4-х тижнів при температурі -20 °C**. Повторних циклів заморожування/відтавання слід уникати.

Кон'югат Антитіл і Ферменту

Використовуйте Буфер для розведення **VP** для розведення Концентратів 100X Кон'югату Антитіл **AK** і Ферментного Кон'югату **EK**. Розведені розчини залишаються стабільними протягом обмеженого часу при температурі 2-8 °C і повинні готуватися щодня свіжі.

Промивний буфер

Необхідний обсяг Промивного Буфера отримують шляхом розведення 1:20 наданого 20-кратного концентрату з деіонізованою водою. Розбавлений Промивний Буфер залишається стабільним протягом максимум 4 тижнів при 2-8 °С. Для використання Промивний Буфер необхідно привести до кімнатної температури!

Мікропланшет

Зберігати невикористані мікротитраційні смужки і лунки разом з осушувачем в щільно закритій упаковці при 2-8 °С. Строк придатності не зменшується в разі правильного зберігання.

Розчин Субстрату

Розчин субстрату (S), стабілізований H₂O₂-тетраметилбензидин, є світлочутливим - зберігати і інкубувати в темряві.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

ЗАУВАЖЕННЯ: Всі визначення (Стандарти, Контрольні Сироватки і зразки) слід аналізувати у двох примірниках. Для отримання оптимальних результатів акуратне піпетування і дотримання протоколу рекомендується.

При виконанні аналізу Стандарти, Контрольна Сироватка і зразки повинні піпетуватися якомога швидше (наприклад, < 15 хвилин). Щоб уникнути спотворень через відмінності в часі інкубації **Кон'югат Антитіл АК і Ферментний Кон'югат ЕК**, а також **Розчин Субстрату S** слід додавати до пластини в тому ж порядку і в тому ж часовому інтервалі кожен, що і зразки. **Стоп Розчин SL** необхідно додавати до планшета у тому ж порядку, що й Субстратний Розчин.

- 1) Додати **100 мкл Буфера для Розведення PP** в лунки A1/A2 (бланк) і
- 2) Піпетувати в позиції B1/2 **100 мкл Стандарту А** (0.02 нг/мл), Піпетувати в позиції C1/2 **100 мкл Стандарту В** (0.1 нг/мл), Піпетувати в позиції D1/2 **100 мкл Стандарту С** (0.3 нг/мл), Піпетувати в позиції E1/2 **100 мкл Стандарту D** (0.6 нг/мл), Піпетувати в позиції F1/2 **100 мкл Стандарту Е** (1 нг/мл).
- 3) Для контролю правильного виконання можна піпетувати **100 мкл розведення 1:21** (або відповідного ступеня розбавлення зразка) у **Буфері для зразків PP** розбавленої **Контрольної Сироватки KS1 і KS2** в позиції G1/2 і H1/2.
- 4) Піпетувати **100 мкл** кожного з **розбавлених зразків** (Наприклад, розбавити 1:21 Буфером для зразка **PP**) в решту лунк, відповідно до вимог.
- 5) Покрити лунки з ущільнювальною стрічкою і інкубувати пластину протягом **2 годин** при **кімнатній температурі** (на швидкості 350 об/хвилину). Після інкубації аспирувати вміст лунк і промити лунки 5 разів **300 мкл Промивного буфера WP** на лунку.
- 6) Після останнього етапу промивання піпетувати **100 мкл розведення 1:100 з Буфером для розведення VP** розбавленого **Кон'югата Антитіл АК** в кожну лунку. Накрийте лунки з ущільнювальною стрічкою і інкубуйте **1 годину** при кімнатній температурі (на швидкості 350 об/хвилину).
- 7) Після інкубації промити лунки 5 разів з **Промивним буфером WP** як описано в кроці 5.
- 8) Після останнього етапу промивання піпетувати **100 мкл розведення 1:100 з Буфером для розведення VP** розбавленого **Ферментного Кон'югата ЕК** в кожну лунку. Накрийте лунки з ущільнювальною стрічкою і інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі (на швидкості 350 об/хвилину).
- 9) Після інкубації промити лунки 5 разів з **Промивним буфером WP** як описано в кроці 5.
- 10) Піпетувати **100 мкл Розчину Субстрату ТМБ S** в кожну лунку.
- 11) Витримати планшет протягом **30 хвилин** в темряві при **кімнатній температурі**.
- 12) Зупинити реакцію додаванням **100 мкл Стоп-розчину SL** в усі лунки.
- 13) Виміряти абсорбцію протягом **30 хвилин при 450 нм** (Референтний фільтр ≥ 590 нм).

ПОБУДОВА СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ

Для оцінки аналізу потрібно, щоб значення абсорбції бланка було нижче 0.3, і оптична щільність Стандарту Е повинна бути вище 0.8. Зразки, які дають більш високі значення абсорбції, ніж значення Стандарту Е, знаходяться поза стандартною кривою; для надійних визначень такі зразки повинні бути повторно протестовані при більш високому розведенні.

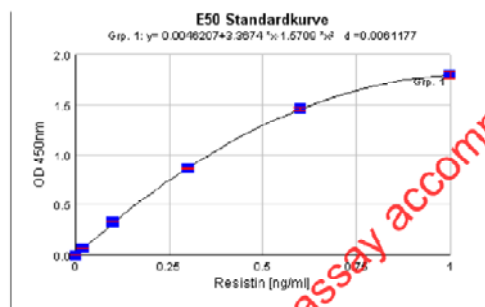
Стандарти, що надаються, містять наступну концентрацію Резистину:

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	0.02	0.10	0.30	0.60	1.00
пг/мл	20	100	300	600	1000

- 1) Розрахувати **середнє значення абсорбції** для бланку з

дубльованого визначення (лунка A1/A2).

- 2) Відніміть середню абсорбцію бланку від середніх абсорбцій всіх інших значень.
- 3) Відкласти значення концентрацій стандартів по осі x навпроти середніх значень оптичної щільності стандартів на осі ординат.
- 4) Рекомендація: Розрахунок стандартної кривої має бути зроблено за допомогою комп'ютерної програми, тому що крива в цілому (без відповідного перетворення) не ідеально описує лінійну регресію. Як правило, підходять наступні методи для оцінки: **Вищого класу поліноміальний**, або **4-параметричний логістичний (4-PL) або нелінійної регресії**.
- 5) **Концентрація Резистину** розведеного зразка або розведеної контрольної сироватки KS1&KS2 в нг/мл (або пг/мл відповідно до обраних одиниць для стандартів) розраховується таким чином; концентрація Резистину **нерозведеного зразка** або KS1&KS2 може бути обчислена **шляхом множення на відповідний коефіцієнт розведення**.



Мал. 1 Приклад Стандартної кривої з поліномом 2-го ступеня

Стандартна крива, наведена на малюнку 1, **не може** бути використана для обчислення результатів випробувань. Служить тільки для прикладу! Ви повинні встановити стандартну криву для кожного тесту, який ви проводите!

Приклад розрахунку концентрації Резистину 1:21 розведеного зразка:

Виміряне затухання вашого зразка 0.85
Вимірюється затухання бланку 0.05

Програма буде розраховувати концентрацію Резистину розведеного зразка автоматично за допомогою різниці зразка та бланку для розрахунку. Ви тільки повинні визначити найбільш підходящу криву (тут: Поліном другого ступеня).

У цьому прикладі використовується наступне рівняння для розрахунку концентрації Резистину в зразку:

$$y = 0.0046207 + 3.3674x - 1.5709x^2 \\ 0.2686 = x$$

Якщо враховується коефіцієнт розведення (**1:21**), концентрація Резистину нерозбавленого зразка становить:

$$0.2686 \times 21 = 5.64 \text{ нг/мл} = 0.00564 \text{ мкг/мл}$$

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Стандарти

Стандарти ІФА Е50 готують з рекомбінантного людського Резистину (19.5 кДа, 2 x 92 амінокислот, виражених в E.coli) в концентраціях 20, 100, 300, 600 і 1000 пг/мл (пікограм/мл, що дорівнює 0.02 нг/мл – 1 нг/мл).

Чутливість

Аналітична чутливість аналізу становить **0.012 нг/мл** (12 пг/мл; 2 SD нульового стандарту в 15X визначеннях).

Специфічність

Сироватка із зазначених видів була розведена (1:10) і використовувалась в якості зразка для аналізу в цій системі. Перехресної реактивності не було виявлено для наступних зразків: велика рогата худоба, кішка, курка, собака, осел, козел, морська свинка, коні, миші, свині, кролики, шури і вівці.

Інтерференція

Було проведено дослідження на вплив фізіологічних речовини на вимірювання Резистину. Зразки сироватки були збагачені різними концентраціями можливо інтерферуючих речовин і кількість Резистину була виміряна і порівняна з концентрацією Резистину в тому ж зразку без будь-якого збагачення. У таблиці 1 приведені отримані результати. Жодна з протестованих речовин значно не впливає на вимірювання Резистину.

Таблиця 1: Інтерференції: Три зразки сироватки, збагачені визначеною кількістю потенційно інтерферуючих речовин і аналізовані. В таблиці вказаний % від нативного Резистину, не збагаченого зразка сироватки

	Тригліцериди 100 мг/мл	Білірубін 100 мкг/мл	Гемолізат 1000 мкг/мл
Сироватка 1	101	93	94
Сироватка 2	115	99	99
Сироватка 3	104	103	147

Таблиця 2: Вивчення впливу інгібіторів коагуляції додаванням зазначених об'ємів інгібіторів до РР, збагачених 0.3 нг/мл Резистину. Відносні кількості Резистину, виміряні в зразках, що містять інгібітор в порівнянні Буфером для зразків (РР), що містить 0.3 нг/мл Резистину.

% Резистину в РР			
		Середнє (n=3)	SD
3.8 г/л	Цитрат	94	7.67
0.0068 моль/л	ЕДТК	93	4.96
30.000 МОд/л	Гепарин	96	4.89

Відтворюваність і точність

Коефіцієнти варіації в аналізі і між аналізами становлять нижче 6.8% і 5%, відповідно. Результати наведені в таблицях 3 і 4.

Таблиця 3: Варіація в аналізі

	Кількість визначень	Середнє значення, нг/мл	Стандартне відхилення, нг/мл	VC (%)
Зразок 1	26	2.91	0.16	5.55
Зразок 2	15	4.58	0.24	5.33
Зразок 3	17	4.60	0.23	5.04
Зразок 4	7	2.50	0.09	3.37
Зразок 5	23	4.09	0.27	6.67

Таблиця 4: Варіація між аналізами

	Кількість визначень	Середнє значення, нг/мл	Стандартне відхилення, нг/мл	VC (%)
Зразок 1	16	2.81	0.13	4.49
Зразок 2	15	4.79	0.24	4.97

Відновлення та Лінійність

Лінійність розведень набору Mediagnost Резистин ІФА Е50 сироватки знаходиться в дуже широкому діапазоні (Див. Таблицю 5).

Таблиця 5: Відновлення та лінійність Розведення Зразків (характерні результати двох різних сироваток)

Розведення	Зразок 1 (нативний 5.5 нг/мл)		Зразок 2 (нативний 2.25 нг/мл)	
	Плюс 5 нг/мл	Відновлення, %	Плюс 12.25 нг/мл	Відновлення, %
1:50	9.71	92.5	14.99	103.4
1:100	10.60	101.0	13.64	94.1
1:200	10.44	99.4	14.10	97.2
1:400	10.32	98.3	14.33	98.8

Різні людські сироватки були насичені рекомбінантним людським Резистином в різних концентраціях (див. в таблиці 6). Відновлення Резистину склало в середньому 98% від теоретично очікуваного значення.

Таблиця 6: Зразки були збагачені 0.3 нг/мл Резистином і аналізовані в порівнянні з незбагаченим зразком. Відносне відновлення доданого Резистину наведено в таблиці 6.

Матриця	Розведення	% Відновлення
Цереброспінальна рідина	1:2	129
Цереброспінальна рідина	1:10	93
Цереброспінальна рідина	1:40	103
Амніотична рідина	1:10	85
Амніотична рідина	1:40	91
Слина	1:10	99
Слина	1:21	86
Сеча	1:10	79
Сеча	1:21	85
Грудне молоко	1:2	97
Грудне молоко	1:10	58
Грудне молоко	1:21	63
Супернатант культури клітин	1:2	100

ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Таблиця 7: Значення для Резистину були визначені з Mediagnost ELISA Е50 у здорових груп пацієнтів та проаналізовані професором д-ром Дж. Kratzsch, Інститут лабораторної медицини, Університет Лейпцига.

Жінки				Резистин (нг/мл):		
Вік (років)	n:	AV:	AV BMI:	AV ± SD:	25-75. процентиль	Мін.-Макс.
18-30	96	23.0	23.1	7.2 ± 2.6	5.4 - 8.8	3.1 - 14.7
31-40	93	36.5	24.3	8.1 ± 2.3	6.4 - 9.6	3.6 - 13.1
41-50	67	44.9	24.8	7.3 ± 2.5	5.7 - 8.1	4.0 - 16.1
51-60	29	54.7	25.0	7.2 ± 2.6	5.4 - 8.5	4.0 - 15.5
61-65	9	62.7	25.2	6.6 ± 1.1	6.0 - 6.7	5.4 - 9.3
Чоловіки				Резистин (нг/мл):		
Вік (років)	n:	AV:	AV BMI:	AV ± SD:	25-75. процентиль	Мін.-Макс.
18-30	107	23.9	24.1	6.4 ± 1.8	5.0 - 7.6	2.5 - 13.1
31-40	59	35.9	25.0	6.7 ± 3.2	4.8 - 7.4	3.8 - 26.9
41-50	66	45.0	25.2	6.5 ± 2.8	4.5 - 7.4	2.4 - 16.7
51-60	36	54.8	26.4	6.1 ± 2.1	4.7 - 7.2	3.2 - 13.3
61-68	20	63.2	25.6	7.2 ± 1.8	6.0 - 8.2	4.5 - 11.2

n = Кількість пробандів, AV = Середнє значення, BMI = індекс маси тіла (кг/м²), SD = стандартне відхилення

Таблиця 8: Групування очікуваних значень

Стать	Кількість	Середнє нг/мл	SD	2.5 процентиль	9.5 процентиль
Жін.	288	6.48	2.44	3.32	11.68
Чол.	264	7.41	2.47	3.68	13.60
Разом	552	6.93	2.49	3.58	13.12

РЕЗЮМЕ - MEDIAGNOST Резистин ІФА Е50

Підготовка реагентів:	Відновлення:	Розведення
Стандарти А-Е	в 750 мкл Буфера для Зразків РР	
Контрольна сироватка KS1	в 250 мкл Буфера для Зразків VP	1:21 з Буфером для Зразків РР
Контрольна сироватка KS2	в 250 мкл Буфера для Зразків VP	1:21 з Буфером для Зразків РР
Кон'югат Антитіл АК		1:100 з Буфером для Розведення VP
Ферментний Кон'югат ЕК		1:100 з Буфером для Розведення VP
Промивний Буфер WP		1:20 з Дист. Водю (Наприклад, загальний обсяг 50 мл в мірній колбі і заповнити до 1000 мл)
Розведення зразка: 1:21 (наприклад, 15 мкл Сироватки з 300 мкл Буфера для зразків РР)		

Процедура аналізу для Подвійних Визначень:

Піпетувати	Реагенти	Позиція
100 мкл	Буфер для Зразків РР (значення бланк)	A1/2
100 мкл	Стандарт А (0.02 нг/мл)	B1/2
100 мкл	Стандарт В (0.1 нг/мл)	C1/2
100 мкл	Стандарт С (0.3 нг/мл)	D1/2
100 мкл	Стандарт D (0.6 нг/мл)	E1/2
100 мкл	Стандарт Е (1.0 нг/мл)	F1/2
100 мкл	Контрольна Сироватка KS1 (розведена)	G1/2
100 мкл	Контрольна Сироватка KS2 (розведена)	H1/2
100 мкл	Розведення Зразків	наступні лунки
Закрити лунки з ущільнювальною стрічкою.		

Інкубація: 2 години при кімнатній температурі, 350 об/хвилину

5 x 300 мкл	Аспірувати вміст лунок і промити 5x з 300 мкл Миючого буфера WP	кожна лунка
100 мкл	1:100 розведений Кон'югат Антитіл АК	кожна лунка

Інкубація: 1 година при кімнатній температурі, 350 об/хвилину

5 x 300 мкл	Аспірувати вміст лунок і промити 5x з 300 мкл Миючого буфера WP	кожна лунка
100 мкл	1:100 розведений Ферментний Кон'югат ЕК	кожна лунка

Інкубація: 30 хвилин при кімнатній температурі, 350 об/хвилину

5 x 300 мкл	Аспірувати вміст лунок і промити 5x з 300 мкл Миючого буфера WP	кожна лунка
100 мкл	Розчин Субстрату S	кожна лунка

Інкубація: 30 хвилин в темноті при кімнатній температурі

100 мкл	Стоп розчин SL	кожна лунка
---------	----------------	-------------

Виміряти абсорбцію протягом 30 хвилин при 450 нм з ≥ 590 нм в якості еталонної довжини хвилі.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com