

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ФЕРИТИН ELISA

Ferritin ELISA

Каталог. №: EIA-4408

Дата випуску інструкції: 2019/05
Версія 6.0



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

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний колориметричний метод для кількісного визначення концентрації Феритину в сироватці або плазмі людини. Феритин ІФА призначений тільки для лабораторного використання.

1.1 Клінічне значення

Феритин - це кульовий білок, який міститься переважно в печінці, і він може зберігати близько 2250 іонів заліза (Fe^{3+}). Молекула феритину складається з білкової оболонки (апоферитину), що складається з важких і легких субодиниць, яка оточує кристалічне ядро, що містить оксид заліза та фосфат. Феритин синтезується в печінці, селезінці та багатьох інших тканинах організму, причому велика концентрація виявляється в печінці, селезінці, кістковому мозку та слизовій оболонці кишечника.

Вимірювані рівні феритину мають пряму кореляцію із загальною кількістю заліза, що зберігається в організмі. Якщо феритин високий, надлишок заліза виводиться з калом. Якщо феритин низький, існує ризик нестачі заліза, який рано чи пізно пізніше може призвести до анемії.

При анемії, феритин сироватки є найбільш чутливим лабораторним тестом на залізодефіцитну анемію. На відміну від цього, рівень феритину в сироватці крові є нормальним або підвищеним при анемії, пов'язаній з хронічним захворюванням. Підвищені рівні феритину в сироватці спостерігалися при гострих та хронічних захворюваннях печінки та лімфоїдних злоякісних пухлинах (лейкемії та лімфомі Ходжкіна). Високий рівень феритину в сироватці крові також асоціюється з підвищеним ризиком інфаркту міокарда у чоловіків. Феритин також використовується як маркер для розладів переважання залізом, таких як гемохроматоз, при якому рівень феритину може бути аномально підвищеним. Феритин є гострофазним реагентом, він часто підвищується під час захворювання.

Вільне залізо токсичне для клітин, і організм має складний набір захисних механізмів для зв'язування заліза в різних компартментах тканин. У клітинах залізо зберігається в комплексі з білком у вигляді феритину або гемосидерину. Апоферитин зв'язується із вільним залізом заліза і зберігає його в залізоподібному стані. В умовах стаціонарного стану рівень феритину в сироватці корелює із загальним вмістом заліза в організмі; таким чином, рівень феритину в сироватці є найбільш зручним лабораторним тестом для оцінки запасів заліза.

2 ПРИНЦИП

ІФА Феритин базується на одночасному зв'язуванні людського феритину з двома моноклональними антитілами, одне з яких іммобілізовано на мікронукловому планшеті, а інше - кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP).

Після інкубації відокремлення зв'язаного/вільного здійснюється простим твердофазним промиванням. Потім фермент, кон'югований з HRP у зв'язаній фракції, реагує з субстратом (H_2O_2) і субстратом ТМБ і набуває синього кольору, який змінюється на жовтий при додаванні стоп-розчину (H_2SO_4).

Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації феритину у зразку. Концентрація феритину у зразку розраховується на основі стандартної кривої.

3 РЕАГЕНТ, МАТЕРІАЛ ТА ІНСТРУМЕНТИ

3.1 Реагенти та матеріали, що постачаються в наборі

1. **Нульовий стандарт** (1 флакон) 3 мл та **Стандарт (Стандарт 1 - 5)**, 5x (1 флакон = 1 мл)
2. **Контроль Феритину** (1 флакон) 1 мл
Концентрація контролю вказана у Сертифікаті аналізу
3. **Ферментний кон'югат** (1 флакон) 12 мл,
Антитіло до Феритину кон'юговане з пероксидазою хрому.
4. **Мікротитрові лунки** (1 відривний мікропланшет)
Антитіло до Феритину абсорбоване на мікропланшеті
5. **Розчин субстрату** (1 флакон) 15 мл
 H_2O_2 -ТМБ 0.26 г/л (уникати контакту зі шкірою)
6. **Стоп-розчин** (1 флакон) 15 мл
Сірчана кислота 0.15 моль/л (уникати контакту зі шкірою)

7. **Промивний розчин 10X** (1 флакон) 50 мл
Фосфатний буфер 0.2 М, pH 7.4

3.2 Необхідні реагенти, які не постачаються в наборі

Дистильована вода.

3.3 Допоміжні матеріали та інструменти

Автоматичний дозатор.

Мікропланшетний зчитувач (450 нм, 620-630 нм)

Примітка

Зберігати всі реагенти від 2 до 8°C у темряві.

Відкривати мішечок реагенту 4 (мікропланшет з покриттям) лише при кімнатній температурі і закривати його одразу після використання. Після відкриття він стабільний до закінчення терміну придатності набору. Не знімати клейку плівку на невикористаних смужках.

4 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Цей набір призначений тільки для використання in vitro лише професійними особами. Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях чи тваринах.
- Під час роботи з наданими реагентами використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту.
- Дотримуйтесь належної лабораторної практики (GLP) для поводження з продуктами крові.
- Весь вихідний матеріал людського походження, використаний для приготування реагентів, був протестований і виявився негативним на вміст антитіл до ВІЛ 1 і 2, HbsAg та HCV. Однак, жоден метод тестування не гарантує відсутність ВІЛ, HBV, HCV чи інших збудників інфекції. Тому, з Калібраторами та Контролями слід поводитись так само, як і з потенційно інфекційним матеріалом.
- Деякі реагенти містять невелику кількість Proclin 300 в якості консерванту. Уникайте контакту зі шкірою або слизовими оболонками.
- ТМБ Субстрат містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, ковтанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб запобігти травмуванню, слід уникати вдихання, ковтання або контакту зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота отруйна і корозійна, і може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу прямих сонячних променів, металів або окислювачів на реагент ТМБ/ H_2O_2 . Не заморожуйте розчин.
- Цей метод дозволяє визначати феритин від 5 до 1000 нг/мл.

5 ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Будь ласка, строго дотримуйтесь послідовності кроків піпетування, передбачених у цьому протоколі. Представлені дані про продуктивність були отримані з використанням конкретних реагентів, перелічених у цій Інструкції з використання.
- Усі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі від 2 ° C до 8 ° C у їхній оригінальній упаковці. Будь-які винятки однозначно вказані. Реагенти є стабільними до закінчення терміну придатності, якщо їх зберігати та поводитись з ними як зазначено вище.
- Дайте всім компонентам набору і зразкам досягти кімнатної температури (22 ° C - 28 ° C) і добре перемішайте перед використанням.
- Не замінюйте компоненти набору з різних партій. Потрібно слідкувати за терміном придатності, надрукованим на етикетках коробки та флаконах. Не використовуйте будь-які компоненти набору після закінчення їх терміну придатності.
- Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, користувач несе відповідальність за те, щоб набір був належним чином перевірений.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу та/або збільшити фон. Для підвищення продуктивності набору на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість промивань.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці залишався стабільним для відтворення результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути відхилень в аналізі. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтесь того ж порядку розподілу. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторити криву реакції на дозу в кожному планшеті.
- Додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка припиняється, після додавання Стоп-розчину. Тому, ТМБ субстрат та Стоп-розчин слід додавати в тій же послідовності, щоб усунути будь-яке відхилення в часі під час реакції.

- Дотримуйтесь вказівок щодо здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контролів та/або пулованих сироваток.
- При розведенні та внесенні реагентів потрібна максимальна точність.
- Мікробіологічно забруднені, сильно ліпемічні або гемолізовані зразки не слід використовувати в аналізі.
- Зчитувачі планшетів вимірюють вертикально. Не торкайтеся дна лунок.

6 ПРОЦЕДУРА

6.1 Підготовка Стандартів (S₀, S₁, S₂, S₃, S₄, S₅)

Стандарти готові до використання та відкалібровані відповідно до 1-го Стандарту ВООЗ Феритин 80/602 та мають наступні концентрації:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
нг/мл	0	5	20	100	400	1000

Зразок з концентрацією більшою, ніж 1000 нг/мл розводять Нульовим Стандартом S₀.

Після відкриття стандарти стабільні 6 місяців при 2°C - 8°C.

6.2 Підготовка промивного розчину

Перед використанням розведіть вміст кожного флакону з концентратом промивного розчину (10X) дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл.

Для менших обсягів дотримуйтесь коефіцієнту розведення 1:10. Розведений промивний розчин стабільний протягом 30 днів при температурі від 2°C до 8°C.

У концентрованому промивному розчині можна спостерігати присутність кристалів; в такому випадку перемішайте даний розчин при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів; для більшої точності розведіть всю пляшку концентрованого промивного розчину до 500 мл, слідкуючи, щоб усі кристали були перенесені, потім перемішайте до повного розчинення кристалів.

6.3 Підготовка зразка

Визначення феритину слід проводити в сироватці або плазмі людини. Зразки можна зберігати при температурі від 2°C до 8°C протягом короткого часу (максимум п'ять днів).

Для більш тривалого зберігання зразок слід заморозити при -20°C. Уникайте повторного заморожування та розморожування.

Контроль готовий до використання.

6.4 Процедура

- Дайте всім реагентам досягнути кімнатної температури (22°C - 28°C) **принаймні протягом 30 хвилин**. В кінці аналізу одразу зберігайте реактиви при температурі 2°C - 8°C: уникайте тривалого впливу кімнатної температури.
- Невикористані мікролункові смужки з покриттям слід поставити у пакет з фольги, що містить осушувач, і зберігати при 2°C - 8°C.
- Щоб уникнути можливого мікробного та/або хімічного забруднення, невикористані реактиви ніколи не зливайте назад в оригінальні флакони.
- Оскільки для того, щоб покращити точність результатів випробувань, необхідно провести визначення у двох примірниках, підготуйте дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (S₀-S₅), дві для кожного Контролю, дві для кожного зразка, одну для Бланку.

Реагент	Стандарт	Зразок/Контроль	Бланк
Зразок/контроль		20 мкл	
Стандарт S ₀ -S ₅	20 мкл		
Кон'югат	100 мкл	100 мкл	
Інкубуйте протягом 1 години при кімнатній температурі (22°C - 28°C). Видаліть вміст з кожної лунки. Промийте лунки 3 рази з 300 мкл розведеного промивного розчину.			
Важлива примітка: під час кожного етапу промивання обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд і видаліть зайвий розчин постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому паперовому рушнику.			
Автоматичний вошер: якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, промийте лунки не менше 5 разів.			
ТМБ субстрат	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (22°C - 28°C) у темряві.			
Стоп-розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обережно потрусіть планшет. Зчитуйте абсорбцію (E) при 450 нм відносно референсної довжини хвилі 620-630 нм або відносно Бланку протягом 5 хвилин.			

7 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролі при нормальному, високому та низькому рівнях діапазону Феритину для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролі слід розглядати як невідомі та значення, що визначаються під час кожної процедури тестування. Слід вести контроль якості діаграми, щоб відстежувати ефективність реагентів, що постачаються. Повинні бути відповідні статистичні методи, що використовуються для встановлення тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Інші параметри, які слід контролювати, включають 80, 50 і 20% перехоплення стандартної кривої для відтворюваності запуску за запуском. Крім того, максимальна поглинаюча здатність повинна узгоджуватися з попередніми даними. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну умов експерименту або погіршення реагентів набору. Для визначення причини відхилень слід використовувати свіжі реагенти.

8 РЕЗУЛЬТАТИ

Середнє значення поглинання

Обчисліть середнє значення поглинань (E_m), що відповідають одиничним точкам стандартної кривої (S₀-S₅) та кожному зразку.

Стандартна крива

Побудуйте значення поглинання стандартів проти концентрації. Проведіть криву, яка найкраще підходить, через накреслені точки. (наприклад: Cubic Spline або Four Parametr Logistic).

Обчислення результатів

Інтерполюйте значення зразків на стандартній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій виражених в нг/мл.

9 РЕФЕРЕНСНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення сироватки включені до наступних інтервалів:

	Середнє значення (нг/мл)	Діапазон (нг/мл)
Жінки	Перед менопаузою	53
	Після менопаузи	105
Чоловіки	175	20 - 400

Будь ласка, зверніть увагу на той факт, що визначення діапазону очікуваних значень для "нормального" населення в даному методі залежить від багатьох факторів, таких як специфічність та чутливість використовуваного методу та типу населення, що досліджується. Тому кожна лабораторія повинна розглядати діапазон, наведений виробником, як загальний показник і визначити свій власний діапазон очікуваних значень на основі корінного населення, де працює лабораторія.

10 ПАРАМЕТРИ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точність

10.1.1 Варіація в аналізі

Варіацію в межах аналізу визначали шляхом повторного вимірювання (15x) трьох різних контрольних сироваток в одному аналізі. Змінюваність в аналізі становить ≤ 7.5%.

10.1.2 Варіація між аналізами

Варіацію між аналізами визначали шляхом повторного вимірювання (16x) трьох різних контрольних сироваток у різних партіях. Змінюваність між аналізами становить ≤ 6.1%.

10.2 Специфічність

Перехресна реакція антитіла, розрахована на основі ваги/ваги, наведена в таблиці:

Ізо-Феритин людської печінки	100%
Ізо-Феритин людської селезінки	80%
Ізо-Феритин людського серця	12%

10.3 Достовірність

Відновлення 12.5 - 25 - 50 - 100 - 200 нг/мл феритину, доданого до зразка, дало середнє значення (± СВ) 98.66% ± 2.90%.

Тест на розведення, проведений на 3 зразках, розведених до 8 разів, дав середнє значення (± СВ) 102.11% ± 5.32%.

10.4 Чутливість

Найнижча концентрація Феритину, яку можна виявити та відрізнити від нульового стандарту, становить 0.04 нг/мл при 95 % межі достовірності.

10.5 Кореляція з RIA

Порівнювали Феритин ELISA EIA-4408 з іншим комерційно доступним аналізом Феритин. Зразки сироватки крові 22 жінок та 32 чоловіків були

проаналізовані в обома тестовими системами. Розраховано криву лінійної регресії (EIA -4408) = 1.11 * (Ferritin Diasorin) – 10.46
 $r^2 = 0.972$

10.6 Хук-ефект

Феритин ІФА, конкурентний імуноферментний аналіз, не виявляє хук-ефекту до 50000 нг/мл.

11 ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти слід утилізувати відповідно до місцевих вимог.

12 БІБЛІОГРАФІЯ

Walter G.O., et al J. Clin. Path., 29 770 - 772 (1973)
Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1, 80 – 82 (1979)
Van Oost, S.A. et al Clin. Chem. , 28/12 ,2429 – 2433 (1982)
Ronald H, et al Clin. Chem., 29/6, 1109 - 1113 (1983)

13 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

ПОМИЛКИ / МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ / ПРОПОЗИЦІЇ

Відсутність колориметричної реакції

- після додавання відсутня реакція на піпетування кон'югату
- забруднення кон'югатів та/або субстрату
- помилки при проведенні процедури аналізу (наприклад, випадкове піпетування реагентів у неправильній послідовності або в неправильний флакон тощо)

Занадто низька реакція (занадто низька ОЩ)

- неправильний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто короткий, температура інкубації занадто низька

Занадто висока реакція (занадто висока ОЩ)

- неправильний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто довгий, температура інкубації занадто висока
- якість води для промивного буфера невідповідна (низький ступінь деіонізації)
- недостатнє промивання (кон'югати не були видалені належним чином)

Незрозумілі викиди

- забруднення піпеток, наконечників або контейнерів
- недостатнє промивання (кон'югати не були видалені належним чином)

Занадто високий КВ% в пробігу

- реагенти та/або смужки, які не були попередньо розігріті до кімнатної температури перед використанням
- омивач для планшетів не миє належним чином (пропозиція: очистити голівку омивача)

Занадто високий КВ % між пробігами

- умови інкубації не постійні (час, температура)
- контролі та зразки не додаються одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірити порядок піпетування)
- варіації пов'язані з людиною



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

