

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФЕРИТИНУ МЕТОДОМ ІФА

Ferritin Test System

Кат. №: 2825-300A

Дата випуску інструкції: 30-03-2022

Версія: 5



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цільове використання: Кількісне визначення концентрацій циркулюючого Феритину в сироватці людини, за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

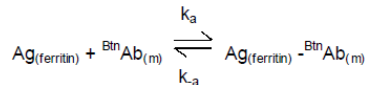
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (ТИП 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до Феритину.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл і сироватки, що містить нативний антиген, між Феритином і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



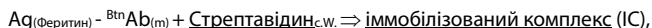
$B^{tn}Ab_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$Ag_{(феритин)}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$Ag_{(феритин)} - B^{tn}Ab_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

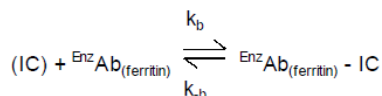
k_{-a} = Константа швидкості дисоціації



$\text{Стрептавідин}_{с.в.}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



де $E^{nz}Ab_{(феритин)}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$E^{nz}Ab_{(феритин)} - IC$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Феритину - 1 мл (мл)/флакон

Шість (6) флаконів калібраторів Феритину з рівнями 0 (A), 10 (B), 50 (C), 150 (D), 400 (E) і 800 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Додано консервант.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки відкалібровані з використанням референсного препарату, що був перевірений відповідно до 3-го IS 94/572 BOO3.

B. Біотиновий реагент Феритину - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить біотинильований моноклональний мишачий IgG у буфері, барвник та консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Ферментний Реагент Феритину - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить IgG анти-феритину, мічені пероксидазою хрому (HRP), в буфері, з барвником та консервантами. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).

I. Інструкція.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Наведені вище реагенти призначені для 96-луноквого мікропланшета. Щодо інших конфігурацій набору зверніться до таблиці в кінці цієї інструкції.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор зі здатністю подавати об'єми 0.025 та 0.050 мл (мл) (25 та 50 мкл (μl)), з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 та 0.350 мл (мл) (100 та 350 мкл (μl)), з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетні вошери або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з довжинами хвиль 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для мікропланшета для кроків інкубації.
7. Вакуумний аспіратор для кроків промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Матеріали контролю якості.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях чи тваринах**

Всі продукти, що містять людську сироватку, були визнані такими, що є не реактивними на поверхневий антиген гепатиту В, ВІЛ 1 і 2 і антитіла до ВГС з реагентами, ліцензованими FDA. Оскільки жоден відомий тест не може забезпечити повну впевненість у відсутності інфекційних агентів, усі продукти людської сироватки слід розглядати як потенційно небезпечні та здатні передавати захворювання. Принципи належної лабораторної процедури поводження з продуктами крові можна знайти в Центрі контролю захворювань/Національному інституті здоров'я, «Біологічна безпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях», 2-е видання, 1988 р., публікація NHS № (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6.0 ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками служать кров, сироватка за типом; дотримуйтесь звичайних запобіжних заходів при зборі зразків венепункцією. Для точного порівняння із встановленими нормальними значеннями слід отримати зразки сироватки вранці натщесерце. Кров слід збирати у звичайну пробірку для венепункції з червоним верхом без добавок або антикоагулянтів. Дайте крові згорнутися. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити отримання зразка натщесерце.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C (°C) протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) протягом 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. При аналізі в дублях потрібно 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролю на рівнях у низькому, нормальному та підвищеному діапазонах для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі та значення повинні визначатися в кожній проведеній процедурі тестування. Слід вести таблиці контролю якості, щоб стежити за показниками реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід застосовувати відповідні статистичні методи. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну експериментальних умов або погіршення стану реагентів. Свіжі реагенти слід використовувати для визначення причини змін.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте при температурі 2-30 °C (°C) до 60 днів.

2. Розчин Робочого субстрату - стабільний протягом одного року.

Влийте вміст бурштинового флакона з розчином «А» у прозорий флакон розчину «В». Закрийте жовтою кришкою прозорий флакон для зручності ідентифікації. Змішайте і позначте відповідно. Зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовуйте забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожної референсної сироватки, контролю та зразка пацієнта для аналізу в дублях. Поверніть невикористані мікролункові стрипи назад в алюмінієвий пакет, щільно закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).
- Піпетуйте 0.025 мл (ml) (25 мкл (µl)) відповідної референсної сироватки, контролю або зразка у призначену лунку.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Біотинового Реагенту Феритину в кожну лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Обережно покрутіть мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати та накрийте його.
- Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Підготовка реагентів»), декантуйте або аспіруйте. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, заповніть кожну лунку, стиснувши пляшку (уникаючи бульбашок

повітря), щоб розподілити промивання. Злийте промивний розчин та повторіть два (2) додаткові рази.

- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) ферментного кон'югату Феритину в кожну лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО РЕАГЕНТУ

- Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Підготовка реагентів»), декантуйте або аспіруйте. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3).
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) розчину Робочого субстрату в кожну лунку (див. «Підготовка реагентів»).

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд.
- Зчитайте абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (nm) (використовуючи референсну довжину хвилі 620-630 нм (nm), щоб мінімізувати вплив дефектів лунки) за допомогою мікропланшетного зчитувача. Результати слід зчитувати протягом тридцяти (30) хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації феритину у невідомих зразках використовується крива доза-відповідь.

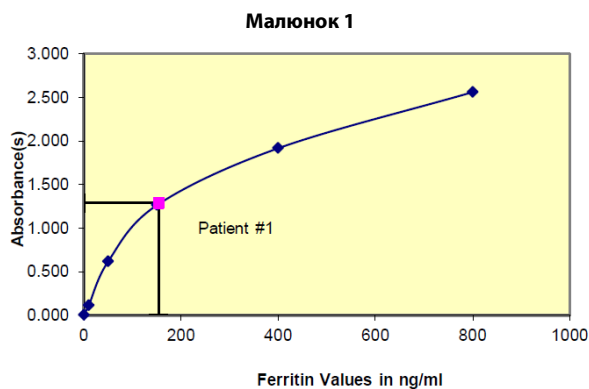
- Запишіть абсорбцію, отриману з роздруківки пристрою для зчитування мікропланшетів, як описано в Прикладі 1.
- Відкладіть на лінійному міліметровому папері абсорбцію для кожного дублікату референсної сироватки проти відповідної концентрації феритину в нг/мл (ng/ml) (не усереднюйте дублікати референсної сироватки перед побудовою графіка).
- Накресліть найкращу криву через нанесені точки.
- Щоб визначити концентрацію феритину для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і прочитайте концентрацію (в нг/мл (ng/ml)) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання (1.287) перетинає криву дози-відповіді при 154 нг/мл (ng/ml) концентрації феритину (див. Рис. 1).

Примітка: Програмне забезпечення для аналізу даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для аналізу даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити програмне забезпечення.

Приклад 1

ID зразка	Лунка	Абсорбція	Середнє абсорбції (B)	Концентрація
Калібратор А	A1	0.002	0.003	0
	B1	0.003		
Калібратор В	C1	0.110	0.112	10
	D1	0.113		
Калібратор С	E1	0.586	0.617	50
	F1	0.647		
Калібратор D	G1	1.204	1.262	150
	H1	1.320		
Калібратор E	A2	1.947	1.917	400
	B2	1.887		
Калібратор F	C2	2.586	2.561	800
	D2	2.536		
Контроль 1	E2	0.707	0.721	66.1
	F2	0.734		
Пацієнт 1	G2	1.289	1.287	154.0
	H2	1.285		
Пацієнт 2	A3	1.647	1.659	301.6
	B3	1.671		

*Дані, представлені в Прикладі 1 і на Малюнку 1, наведені лише для ілюстрації і не повинні використовуватися замість кривої дози-відповіді, підготовленої для кожного аналізу.



Absorbance(s) - Абсорбція(ї)
 Ferritin Values in ng/ml - Значення Феритину в нг/мл (ng/ml)
 Patient #1 - Пацієнт №1

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора $F \geq 1.3$.
2. Оптична щільність калібратора $A \leq 0.05$.
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризиків для цього продукту доступні на запит від Monobind Inc.

12.1 Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу.
3. Не використовувати високоліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати криву доза-відповідь.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind інструкцій можуть давати невірні результати.
10. Необхідно суворо дотримуватися всіх застосованих національних стандартів, нормативних актів і законів, включаючи, але не обмежуючись, належними лабораторними процедурами, щоб забезпечити відповідність і належне використання пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, зчитувачів, вошерів та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/EC IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитися досвідченими професіоналами.**
2. Лабораторні результати є лише одним із аспектів визначення догляду за пацієнтом і не повинні бути єдиною основою терапії, особливо якщо результати суперечать іншим детермінантам.
3. Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних інтерференцій; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тестовими реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних досліджень», Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Зразки пацієнта з концентрацією феритину вище 800 нг/мл (ng/ml) можуть бути розведені (наприклад 1/10) з нормальною сироваткою вільною від феритину і повторно аналізовані. Концентрація зразка визначається шляхом множення результату на коефіцієнт розведення (10).
8. Кожен компонент в одному аналізі повинен бути того ж номера партії і зберігатися в однакових умовах.

13.0 ОЧІКУВАНИЙ ДІАПАЗОН ЗНАЧЕНЬ

Орієнтовні референсні діапазони для нормальних дорослих чоловіків і жінок були визначені за допомогою 400 нормальних сироваток з Тест-системою Феритин AccuBind® ІФА.

Чоловіки	16-220 нг/мл (ng/ml)
Жінки	10-124 нг/мл (ng/ml)

На додаток до вищесказаного наступні діапазони були встановлені на основі доступної літератури. Тим не менше, ці діапазони були підтверджені за допомогою процедури мікропланшетного ІФА AccuBind® Феритин з обмеженою кількістю зразків.

Новонароджені	22-220 нг/мл (ng/ml)
1-2 місяці	190-610 нг/мл (ng/ml)
2-5 місяців	50-220 нг/мл (ng/ml)
6 місяців-16 років	10-160 нг/мл (ng/ml)

Важливо мати на увазі, що встановлення будь-якого нормального діапазону залежить від безлічі факторів, таких як специфічність методу, місцевість, тестована популяція і точність методу в руках фахівців. З цих причин кожна лабораторія залежить від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки не буде встановлено власний діапазон техніками лабораторії з використанням методу з корінним населенням в районі, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність Тест-системи Феритин AccuBind® ІФА в аналізі і між аналізами визначалася в аналізі трьох різних рівнів контрольної сироватки. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для кожної з цих контрольних сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Зразок	Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))			
	N	X	δ	C.V., %
Рівень 1	20	43.5	1.36	3.1
Рівень 2	20	110.5	6.10	5.5
Рівень 3	20	349.6	7.54	2.2

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	X	δ	C.V., %
Рівень 1	10	41.2	2.33	5.5
Рівень 2	10	113.2	8.11	7.2
Рівень 3	10	372.4	11.80	3.2

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Мінімальна доза, яку можна визначити (чутливість), визначається як очевидна концентрація на 2σ вище абсорбції для нульового калібратора. 2σ середньої абсорбції для двадцяти повторів нульового калібратора для Тест-системи Феритин АссуВінд® ІФА дало чутливість 0.17 нг/мл (ng/ml).

14.3 Специфічність

Перехресна реактивність Тест-системи Феритин АссуВінд® ІФА з вибраними речовинами була оцінена додаванням інтерферуючих речовин до сироваткової матриці в різних концентраціях. Перехресна реактивність була розрахована як відношення дози інтерферуючої речовини до дози Феритину, необхідного для одержання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність
Феритин печінки	100%
Феритин селезінки	100%
Феритин серця людини	< 1.0%
Гемоглобін	< 0.1%

14.4 Ефект високої дози

Оскільки аналіз є послідовним, високі концентрації феритину не показують хук-ефект. Зразки з концентраціями більше 50000 нг/мл (ng/ml) продемонстрували надзвичайно високі рівні абсорбції.



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поїнт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

