



Унитарное предприятие
«Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича В.Ф.,
5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФЕРРИТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

«ИФА-Ферритин»

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор «ИФА-Ферритин» предназначен для количественного определения ферритина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Количественное определение уровня ферритина в крови имеет диагностическое значение при оценке железодефицитных состояний и ряде онкологических заболеваний.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

№	Название компонента	Количество
1	Иммуносорбент	1 шт.
2	КРП (Концентрат раствора для промывания планшета)	1 фл. 40 мл
3	Буферный раствор для разведения сывороток и конъюгата	1 фл. 40 мл
4	СБР (Субстратный буферный раствор)	1 фл., 22 мл
5	Конъюгат	1 мкпр., 0,25 мл
6	Раствор ТМБ	1 фл., 1,2 мл
7	Калибровочные пробы (0-500 нг/мл)	6 мкпр. по 0,35 мл
8	Контрольная сыворотка	3 мкпр. по 0,2 мл
9	Стоп-реагент	1 фл., 12 мл

2.2 Набор ИФА-Ферритин рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, одной контрольной и 6 калибровочных проб (количество реагентов рассчитано на 3 постановки по 4 стрипа)

2.3 Принцип работы набора состоит в следующем.

Иммуноферментный анализ (ИФА) ферритина является твердофазным анализом с использованием пары моноклональных антител к различным антигенным детерминантам молекулы ферритина. Анализ проводится в две стадии.

Во время первой инкубации ферритин, присутствующий в неизвестных пробах сыворотки крови или калибровочных пробах, связывается с моноклональными антителами, иммобилизованными на стенках планшета, а во время второй инкубации - с моноклональными антителами, меченными пероксидазой хрена. После промывки в лунках планшета остаются адсорбированные антитела к ферритину, меченные пероксидазой хрена. Их количество пропорционально количеству ферритина в калибровочных пробах и исследуемых образцах. После стадии промывки проводят ферментативную реакцию пероксидазы с субстратом.

Во всех лунках измеряют поглощение при 450 нм.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциальный источник инфицирования вирусами ВИЧ, гепатита и других вирусных инфекций.

3.2 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1 спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета или стрипа при 450 нм;
-полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (в ошер);
-встряиватель для планшетов;
-вихревой смеситель;
-пипетки полуавтоматические, позволяющие отбирать объемы жидкостей: ; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,5 и 1 мл;

-цилиндры мерные, позволяющие отмерять 50 мл;
-стаканы вместимостью 500-1000 мл;
-вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА (из расчета на 32 лунки)

5.1 За 30 мин. до проведения анализа компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови должны быть перенесены из холодильника в помещение с температурой (18-22) °С.

5.2 Предварительное разведение исследуемых сывороток. Если значения ферритина в исследуемых образцах сывороток выше 500 нг/мл, образцы следует развести буфером в 10 или 100 раз, например:

разведение в 10 раз: 20 мкл исследуемого образца + 180 мкл буфера (раствор «а»);

разведение в 100 раз: 20 мкл раствора «а» + 180 мкл буфера.

Разведенные образцы нужно анализировать так же, как и цельную сыворотку. Результаты надо умножить на коэффициент разведения 10 или 100 соответственно.

5.3 Вскрыть упаковку с иммуносорбента.

5.4 Калибровочные пробы. Жидкие калибровочные пробы используются без предварительной подготовки и хранятся на протяжении всего срока годности при температуре (2-8) °С.

5.5 В микропробирку с контрольной сывороткой внести 0,2 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать до полного растворения, избегая образования пены. Для проведения одного ИФА-анализа использовать 1 микропробирку с контрольной сывороткой.

5.6 Приготовление раствора для промывания планшета

Содержимое флакона концентрата раствора для промывания планшета интенсивно встряхнуть, отобрать 12 мл раствора в мерный стакан вместимостью 700 мл, добавить 540 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Если концентрат промывочного буфера содержит кристаллы, его необходимо прогреть перед использованием при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

5.7 Конъюгат. Внести во флакон 7,0 мл буферного раствора для разведения конъюгата и добавить к нему 0,06 мл конъюгата. Тщательно перемешать.

5.8 Приготовление хромоген-субстратного раствора. В чистый флакон отобрать 7 мл СБР и добавить 0,35 мл раствора ТМБ, тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! *Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствором проявителя должен быть бесцветным.*

5.9 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом: N1 - B₀, N2 - B₁, N3 - B₂, N4 - B₃, N5 - B₄, N6 - B₅, N_{кс} - контрольная сыворотка, N_х - неизвестные образцы.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Отобрать из каждого флакона с калибровочными пробами, КС и неизвестными образцами по 0,05 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.2 Во все промаркированные лунки, внести по 0,15 мл буферного раствора для разведения сывороток и конъюгата. Инкубировать стрипы 1,5 ч. при постоянном встряхивании и температуре (18-22) °С.

6.3 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза раствором для промывания планшета см.п.5.6 (по 0,30 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.4 Во все промаркированные лунки внести по 0,2 мл конъюгата, приготовленного по п. 5.7. Инкубировать стрипы 1,5 ч при постоянном встряхивании и температуре (18-22) °С.

6.5 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза раствором для промывания планшета см.п.5.6 (по 0,30 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.6 Во все лунки внести по 0,2 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 5.8 и инкубировать стрипы при температуре (18-22) °С в темноте в течение 15-20 мин (по мере развития окраски).

6.7 Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,1 мл стоп-реагента, встряхнуть стрипы. Измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора во всех лунках при 450 нм не позже чем через 15 мин после остановки реакции.

6.8 Построить калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации ферритина в калибровочных пробах и по калибровочному графику определить содержание ферритина в неизвестных образцах.

7 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

7.1 Специфичность.

Перекрестная реакция антител к ферритину с гемоглобином и трансферрином отсутствует.

7.2 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов 10 определений ферритина в одном и том же образце с использованием набора ИФА-Ферритин не превышает 10%.

7.3 Линейность.

Зависимость концентрации ферритина в образцах сыворотки крови при разведении их буферным раствором имеет линейный характер.

7.4 Точность.

Данный аналитический параметр проверялся тестом на "открытие" ферритина, добавленного в образцы сыворотки крови с различным содержанием эндогенного ферритина. Процент открытия составляет (90 – 110)%.

7.5 Клиническая проверка.

Содержание ферритина измеряли в сыворотке крови здоровых доноров, больных железодефицитными анемиями и острыми лейкозами. Концентрация ферритина у здоровых мужчин составляет 20-250 нг/мл; женщин 20-200 нг/мл, больных железодефицитными анемиями – меньше 20 нг/мл и при острых лимфоцитарных лейкозах – свыше 500 нг/мл в соответствии с данными литературы

7.6 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора ИФА-Ферритин уточнить значения концентраций ферритина, соответствующие нормальным.

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1 Компоненты набора ИФА-Ферритин должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

8.2 Избегать замораживания жидких компонентов набора..

8.3 При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на пробках не осталось сухого вещества.

8.4 Не смешивать реактивы из разных серий.

8.5 Не держать реактивы во время хранения и инкубации на ярком свету.

8.6 Исследуемые образцы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 48 ч после взятия пробы. Для более длительного хранения исследуемые образцы могут храниться при минус 20 °С.

8.7 Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизованную, мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

8.8 Если содержание ферритина в анализируемом образце превышает 500 нг/мл, необходимо провести повторный анализ, разбавив образец в 10 или 100 раз буфером.

8.9 Для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции и квалифицированное проведение анализа.