

Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Факс (37517) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРРИТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ИФА-Ферритин

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ Л.А.Постоялко
"18" 12 2001 г.

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:

- иммуносорбент – 96-луночный стриповый планшет с иммобилизованными антителами к ферритину, 1 планшет;
- калибровочные пробы в диапазоне концентраций ферритина (0-500) нг/мл (точные значения концентраций ферритина указываются на этикетках микропробирок), жидкие препараты, 6 микропробирок по 0,4 мл. Калибровочные пробы ферритина откалиброваны относительно контрольных сывороток "BIO-RAD", США, кат.№ 371, 372, 373;
- контрольная сыворотка (КС), лиофилизированный или жидкий препарат, 1 флакон; 0,5 мл;
- конъюгат – моноклональные антитела к ферритину, меченные пероксидазой хрена, жидкий препарат, 1 микропробирка; 0,5 мл;
- буферный раствор для разведения сывороток и конъюгата, жидкий препарат, 2 флакона по 20 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), жидкий препарат, 2 флакона по 12 мл;
- хромоген 3,3',5,5'-тетраметил-бензидин (хромоген ТМБ), жидкий препарат, 1 флакон; 1,5 мл;
- концентрат раствора для промывания планшета (КРП), жидкий препарат, 2 флакона по 20 мл;
- стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, 12 мл.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, одной контрольной и 6 калибровочных проб - всего 96 определений.

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 длине волны 450 нм.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенци-

ально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.2 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.3 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 при длине волны 450 нм;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
 - встряхиватель для планшетов;
 - вихревой смеситель;
 - пипетки полуавтоматические, позволяющие отбирать объемы жидкостей: 0,020; 0,050; 0,100; 0,125; 0,150; 0,180; 0,200; 0,500; 7,000 и 12,000 мл;
 - цилиндры мерные вместимостью 50 и 2000 мл;
 - стаканы лабораторные стеклянные вместимостью 1000 или 3000 мл;
 - флакон вместимостью 20 мл, 2 шт.;
 - вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

(из расчета на 32 лунки)

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-22)°С в течение 30 мин.

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

разведение в 10 раз: 0,020 мл (20 мкл) исследуемого образца + 0,180 мл (180 мкл) буферного раствора для разведения сывороток (раствор "а");

разведение в 100 раз: 0,020 мл (20 мкл) раствора "а" + 0,180 мл (180 мкл) буферного раствора для разведения сывороток.

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

5.3 Вскрыть упаковку и снять защитную пленку с иммуносорбента.

5.4 Во флакон с КС (если она лиофилизована) внести 0,5 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены. Растворенную контрольную сыворотку можно хранить при (2-8)°С в течение 3 сут; при необходимости более длительного хранения – при температуре не менее минус 18°С.

5.5 Приготовление раствора для промывания планшета

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

Содержимое флаконов с КРП интенсивно встряхнуть. Отобрать 12,0 мл раствора в мерный стакан вместимостью 1000 мл, добавить 540,0 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

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

5.6 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении

В чистый флакон вместимостью 20 мл внести 7,0 мл буферного раствора для разведения сывороток и конъюгата, добавить 0,125 мл конъюгата. Тщательно перемешать.

5.7 Приготовление хромоген-субстратного раствора

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 7,0 мл СБР, добавить 0,35 мл хромогена ТМБ и 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 хромоген-субстратный раствор должен быть бесцветным.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах маркировать следующим образом: №1 - В₀, №2 - В₁, №3 - В₂, №4 - В₃, №5 - В₄, №6 - В₅, В_х - исследуемые образцы.

6.2 Отобрать из каждой микропробирки с калибровочными пробами или пробирки с исследуемыми образцами по 0,05 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.3 Во все промаркированные лунки, внести по 0,15 мл буферного раствора для разведения сывороток. Инкубировать планшет при комнатной температуре (18-22)°С в течение 1,5 ч при постоянном встряхивании.

6.4 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза раствором для промывания планшета, приготовленным по п.5.5 (по 0,35 мл в каждую лунку). Удалить остатки жидкости.

6.5 Во все промаркированные лунки внести по 0,2 мл конъюгата, приготовленного по п. 5.6. Инкубировать планшет или стрипы при комнатной температуре в течение 1,5 ч при постоянном встряхивании.

6.6 Удалить содержимое лунок. Повторить стадию промывки (п.6.4).

6.7 Во все лунки внести по 0,2 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 5.7 и инкубировать при комнатной температуре в темноте в течение (10-20) мин по мере развития окраски.

6.8 Остановить реакцию добавлением во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента, встряхнуть планшет. Измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм не позже чем через 15 мин после остановки реакции.

6.9 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в оптических единицах (ОЕ), а по оси абсцисс – значения концентраций ферритина, в нг/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

По калибровочному графику определить содержание ферритина в исследуемых образцах.

7 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

7.1 Специфичность

Перекрестная реакция антител к ферритину с гемоглобином и трансферрином отсутствует.

7.2 Чувствительность

Минимальная концентрация ферритина, достоверно определяемая с помощью набора, составляет не более 4 нг/мл.

7.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации ферритина в образцах сыворотки крови с использованием набора не превышает 10%.

7.4 Тест на "открытие"

Процент "открытия" ферритина, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ферритина, составляет (80-120)%.

7.5 Клиническая проверка набора

Содержание ферритина измеряли в сыворотке крови здоровых доно-ров, больных железодефицитными анемиями и острыми лейкоза-ми. 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 уточнить значения концентраций ферритина, соответствующие нормальным.

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

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

8.3 Не смешивать реактивы из разных серий.

8.4 Не держать реактивы во время хранения и инкубации на ярком свете.

8.5 Исследуемые образцы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 48 ч после взятия пробы. Для более длительного хранения образцы следует заморозить при температуре не менее минус 20 °С.

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

8.7 Если содержание ферритина в анализируемом образце превышает 500 нг/мл, необходимо провести повторный анализ, разбавив образец в 10 или 100 раз буферным раствором для разведения сывороток.

8.8 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

8.9 Срок годности набора 6 месяцев.