IMMUNOASSAYS AND SERVICES
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

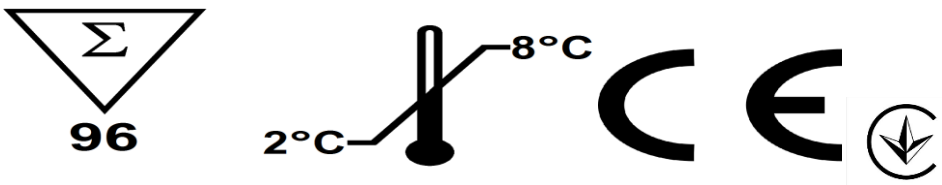
Будь ласка, використовуйте тільки дійсну версію Інструкції з користування,

що надається разом із набором

Інструкція з експлуатації
Лептин ІФА

ME E-0300

IVD



Версія: 11.0 *2020-06-24*

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Для кількісного визначення лептину в сироватці крові людини методом імуноферментного аналізу.
Тільки для діагностики in vitro.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Принцип наступного імуноферментного аналізу слідує типовому двоступінчастому захопленню або аналізу типу "сендвіч" . Аналіз використовує два високоспецифічних моноклональних антитіла: моноклональне антитіло, специфічне для лептину, іммобілізується на мікропланшеті та іншому моноклональному антитілі, специфічному для іншого епітопу лептин кон'югованого біотину. На першому етапі лептин, присутній у зразках і стандартах, пов'язується з іммобілізованим антитілом та біотинільованим антитілом, утворюючи, таким чином, бутербродний комплекс. Надмірне і незв'язане
біотинільоване антитіло видаляють на стадії промивання. На другому кроці додають стрептавідин-HRP, який зв'язує спеціально до будь-якого зв'язаного біотинильованого антитіла. Знову ж таки, незв'язаний стрептавідин-HRP видаляється стадією промивання.
Потім додають ферментний субстрат (ТМБ), утворюючи продукт синього кольору, який прямо пропорційний присутній кількості лептину . Ферментативна реакція припиняється додаванням стоп розчину, перетворюючого синій колір в жовтий колір. Поглинання вимірюється на рідері мікропланшетів 450 нм. Сукупність стандартів використовується для побудови стандартної кривої, з якої кількість лептину в зразках пацієнтів і контролях можна безпосередньо прочитати.

КЛІНІЧНІ ЗАСТОСУВАННЯ

Лептин людини - 16 кДа, 146 амінокислотних залишків, неглікозильований поліпептид. Лептин декодується О.Б. геном. Його основним джерелом є жирова тканина, а її концентрація в циркуляції побічно відображає запаси жиру в тілі.
Концентрації лептину в плазмі або в сироватці крові збільшуються у людей з ожирінням і сильно співвідносяться зі ступенем ожиріння, що виражається у відсотках тіла жиру або індексу маси тіла. Нещодавно виявлений гормон лептин сприяє регуляції енергетичного балансу, інформуючи мозок про кількість жирної тканини в тілі. Тоді мозок може зробити відповідні коригування у витратах або споживанні енергії. Багато областей фізіології лептину ще не досліджені. Роль лептину в метаболізмі, чутливість до інсуліну, потенційна терапевтична модальність для схуднення, а також залучення до ендокринної функції, є активними областями дослідження. Хоча майбутнє лептину як терапевтичного агенту незрозуміло, його участь у багатьох областях фізіології, безсумнівно, робить його новим гормоном, який потребує широкого вивчення в майбутньому для розуміння його фізіології.

ПРОЦЕДУРНІ ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

1. Цей набір призначений тільки для використання in vitro.
2. Практикуйте наступні належні лабораторні практики при роботі з комплектами реагентів:
- Не піпетувати ротовою порожниною.
- Не палити, не пити і не їсти в місцях, де обробляються зразки або комплектуючі реагенти.
- Під час обробки зразків та набору реагентів одягайте захисний одяг та одноразові рукавички.
- Після виконання випробувань уважно промийте руки.
- уникати контакту з очима; використовувати захисні окуляри; у разі контакту, негайно промити водою і зв'язатися з лікарем.
3. Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору. Надійна продуктивність буде досягнута лише шляхом суворого та ретельного дотримання наданих інструкцій.
4. Уникайте мікробного забруднення реагентів.
5. Для кожного прогону має бути встановлена стандартна крива.
6. Всім клієнтам рекомендується підготувати власні контрольні матеріали або сироватки, які повинні бути включені у кожний пробіг на високому та низькому рівні для оцінки достовірності результатів.
7. Контролі (включені в набір) повинні бути включені в кожен прогон і входити до встановлених довірчих меж.

8. Коли використання води призначене для розведення або відновлення, використовуйте дейонізовану або дистильовану воду.
9. Всі реагенти та зразки комплектів повинні бути доведені до кімнатної температури та змішані м'яко, але ретельно перед використанням. Уникайте повторного заморожування та відтавання реагентів та зразків.
10. Неправильні процедурні методи, неточне піпетування, неповне промивання, а також неправильне зберігання реагентів може бути причиною, коли значення аналізу для контролю не відображають встановлені діапазони.
11. При читанні мікропланшету присутність бульбашок у лунках вплине на оптичну густину (ОГ).
Перед виконанням кроку читання ретельно видаліть всі бульбашки.
12. Розчин субстрату (ТМБ) чутливий до світла і, якщо він правильно зберігається, повинен залишатись безбарвним. Нестабільність або забруднення може бути позначено розвитком синього кольору, в цьому випадку він не повинен бути використаний.
13. При розподілі субстрату та стоп розчину не використовуйте піпетки, в яких ці рідини знаходяться в контакті з будь-якими металевими деталями.
14. Щоб запобігти забрудненню реагентів, використовуйте новий одноразовий наконечник піпетки для видачі кожного реагенту,зразку, стандарту і контролю.
15. Не змішуйте різні партії компонентів комплекти в рамках тесту і не використовуйте будь-який компонент поза межами терміну дії, вказаного на етикетці.
16. Реактиви наборів повинні розглядатися як небезпечні відходи та утилізуватися відповідно до місцевих та / або національних правил.

ОБМЕЖЕННЯ

1. Всі реактиви в комплекті калібруються для прямого визначення лептину в сироватці людини. Комплект не калібрований для визначення лептину в слині, плазмі або інших зразках людини або тваринного походження.
2. Не використовуйте грубо гемолізовану, грубо липемічну, жовтяничну або неправильно збережену сироватку.
3. Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тимеросал, несумісні з цим набором, оскільки вони можуть призвести до помилкових результатів.
4. Для розбавлення будь-яких високих зразків сироватки можна застосовувати лише аналітичний буфер. Використання будь-якого іншого реагенту може призвести до помилкових результатів.
5. Результати, отримані в цьому наборі, ніколи не повинні використовуватися як єдина основа для клінічного діагнозу. Наприклад, виникнення гетерофільних антитіл у пацієнтів, які регулярно контактують з тваринами чи продуктами тваринного походження, має потенціал викликати втручання в імунологічні тести. Отже, клінічний діагноз повинен включати всі аспекти пацієнта, включаючи частоту впливу тварин / продуктів, якщо хибні результати підозрюються.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ ЩОДО ОБЕРТАННЯ ПОТЕНЦІЙНО БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Всі зразки сироватки повинні розглядатися як потенційно біологічно небезпечні та обертатися з уживанням відповідних запобіжних заходів.

ХІМІЧНА НЕБЕЗПЕКА

Уникайте контакту з реагентами, що містять ТМБ, перекис водню та сірчану кислоту. Якщо відбувся контакт з будь-яким з цих реагентів, промити великою кількістю води. ТМБ - це підозрюваний канцероген.

ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

Приблизно 0,1 мл сироватки необхідно для визначення в дублікатах. Зберіть 4-5 мл крові в відповідним чином помічені пробірки і дозвольте їй згорнутися. Центрифугувати і ретельно видалити сироватковий шар. Зберігати при 4 ° С протягом 24 годин або -10 ° С або нижче, якщо аналізи повинні бути зроблені пізніше. Розглядати всі людські зразки, як можливо біологічно небезпечні речовини, і вживати відповідних запобіжних заходів під час обробки.

РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ НЕОБХІДНІ, ЯКІ НЕ НАДАНІ

1. Точна піпетка для доставки 20-100 мкл
2. Одноразові наконечники піпетки
3. Дистильована або дейонізована вода
4. Шейкер мікропланшетів
5. Вошер мікропланшетів (рекомендується)
6. Рідер мікропланшетів з фільтром, встановленим на 450 нм, а верхня межа ОГ становить 3,0 або більше.

НАДАНІ РЕАГЕНТИ

1. AA E-0030 WASH CONC x10

Буферний концентрат для миття - X10

Зміст: одна пляшка, що містить буфер з неіонним миючим засобом і консервант, що не містить ртуті.

Об'єм: 50 мл / пляшка

Зберігання: охолодженим при 2-8oC

Стабільність: 12 місяців або як вказано на етикетці

Приготування: Перед використанням розбавте 1:10 у дистильованій або дейонізованій воді. Якщо всю платівку потрібно використовувати, розбавте 450 мл промивного буферного концентрату в 450 мл води.

2. **AA E-0055 SUBSTRATE ТМБ субстрат** - готовий до використання.

Зміст: одна пляшка, що містить тетраметилбензидин і перекис водню, в буфері, що не містить ДМФ або ДМСО.

Об'єм: 16 мл / пляшка

Зберігання: охолодженим при 2-8oC

Стабільність: не відкриті реагенти при 2-8 ° C до закінчення терміну придатності на етикетці.

3. AA E-0080 СТОП РОЗЧИН - готовий до використання.

Зміст: один флакон містить 1M сірчаної кислоти.

Об'єм: 6 мл / пляшка

Зберігання: охолоджуваним при 2-8oC

Стабільність: не відкриті реагенти при 2-8 ° C до закінчення терміну придатності на етикетці.

Ідентифікація небезпеки :

H290 Може бути корозійним до металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

4. Стандарти та контролі - готові до використання.

Нижче наведені приблизні концентрації, будь ласка, зверніться до етикеток флаконів для точних концентрацій:

Каталожний номер	Позначення	Стандарт	Концентрація	Об’єм/флакон
ME E-0301	STANDART A	Стандарт A	0 нг/мл	0,5 мл
ME E-0302	STANDART B	Стандарт B	1 нг/мл	0,5 мл
ME E-0303	STANDART C	Стандарт C	5 нг/мл	0,5 мл
ME E-0304	STANDART D	Стандарт D	10 нг/мл	0,5 мл
ME E-0305	STANDART E	Стандарт E	20 нг/мл	0,5 мл
ME E-0306	STANDART F	Стандарт F	50 нг/мл	0,5 мл
ME E-0307	STANDART G	Стандарт G	100 нг/мл	0,5 мл
ME E-0351	CONTROL 1	Контроль 1	Зверніться до етикеток флаконів для очікуваного значення та прийнятного діапазону!	0,5 мл
ME E -0352	CONTROL 2	Контроль 2		0,5 мл

Зміст: лептин у білковому буфері з не-ртутним консервантам. Підготовлено збагаченням буферу з певною кількістю лептину.
Зберігання: охолодженим при 2-8оС
Стабільність: не відкриті реагенти при 2-8 ° С до закінчення терміну придатності на етикетці

5. ME E-0313 ASSAY BUFF Буфер аналізу - готовий до використання.
Зміст: один флакон з білковим буфером з не-ртутним консервантом.
Об'єм: 20 мл / пляшка
Зберігання: охолодженим при 2-8оС
Стабільність: не відкриті реагенти при 2-8 ° С до закінчення терміну придатності на етикетці.

6. ME E-0331
Мікропланшет розбірний , покритий моноклональними анти - лептин антитілами
- Готовий до використання.
Зміст: один 96-лунковий (12x8) моноклональний з покриттям антитілами мікропланшет в закритому пакеті з осушувачем.
Зберігання: охолоджувати при 2-8оС
Стабільність: 12 місяців або як вказано на етикетці.

7. ME E-0341 BIOTIN AB
Моноклональний анти – лептин - біотиновий кон'югат
Зміст: одна пляшка, що містить моноклональне анти - лептинове антитіло, кон'юговане до біотину в білковому буфері з не-ртутним консервантом.
Об'єм: 10 мл / пляшка
Зберігання: охолоджуваним при 2-8оС
Стабільність: 12 місяців або як вказано на етикетці.

8. ME E-0340 CONJUGATE – CONC
Стрептавідин -HRP кон'югатний концентрат - X50
Зміст: один флакон містить стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрону на білковому основі буферу з не-ртутним консервантам.
Об'єм: 0,4 мл / флакон
Зберігання: охолодженим при 2-8оС
Стабільність: не відкриті реагенти при 2-8 ° С до закінчення терміну придатності на етикетці.
Приготування: перед вживанням розбавте 1:50 в буфері аналізу (наприклад, 40 мкл концентрату в 2 мл буфера аналізу). Якщо весь планшет використовується, розбавте 240 мкл концентрату в 12 мл буфера аналізу. Видалити будь-що, що залишилося.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ
Всі реагенти повинні досягати кімнатної температури перед використанням. Стандарти, контролі та зразки повинні бути проаналізовані в двох примірниках. Як тільки процедура буде запущена, всі кроки повинні бути завершені без перерви.
1. Підготувати робочі розчини стрептавідин -HRP-кон'югату та промивного буфера.
2. Прокапайте 20 мкл кожного стандартного, контрольного та сироваткового зразків у відповідні помічені лунки в дублікатах.
3. Прокапайте 80мкл моноклонального анти – лептин - біотинового кон'югату в кожну лунку.
4. Інкубуйте на шейкері мікропланшетів (приблизно 200 об / хв) протягом 1 години при кімнатній температурі.
5. Промивайте лунки 3 рази готовим промивним буфером (300мкл / лунка для кожної промивки) та ретельно

постукайте пластиною об абсорбуючій папір, щоб він був сухим. Рекомендовано використання вошера.
6. Прокапайте 100 мкл підготовленого стрептавідин -HRP-кон'югату в кожну лунку.
7. Інкубуйте на шейкері мікропланшетів (приблизно 200 об / хв) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
8. Промивайте лунки 3 рази готовим промивним буфером (300мкл / лунка для кожної промивки) та ретельно постукайте планшетом об абсорбуючій папір, щоб він був сухий. Рекомендовано використання вошера.
9. Прокапайте 100 мкл субстрату ТМБ в кожну лунку з однаковим інтервалом часу.
10. Інкубуйте на шейкері мікропланшетів 10-15 хвилин при кімнатній температурі.
11. Прокапати 50 мкл стоп розчину в кожну лунку за однакових інтервалів часу, як на етапі 9.
12. Через 20 хвилин після додавання стоп розчину прочитайте мікропланшет на рідері планшетів при 450 нм.

РОЗРАХУНКИ

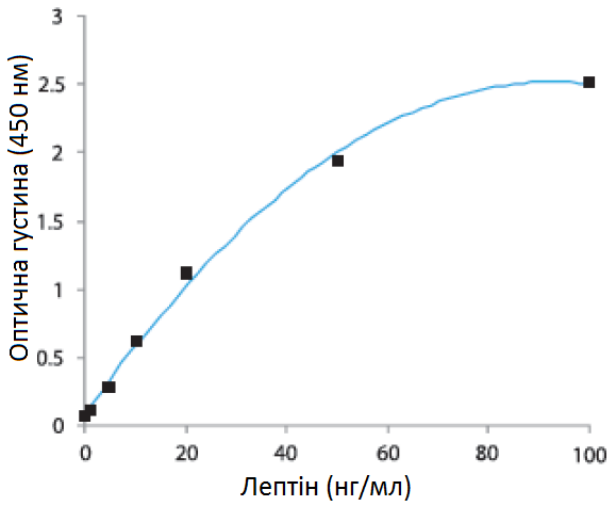
1. Обчислити середню оптичну густину кожного стандартного дубліката.
2. Намалюйте стандартну криву на напівлогаріфмічному папері із середньою оптичною густиною на вісі Y і концентрацією стандартів на осі X. Якщо використовується програмне забезпечення для імуноаналізу, то 4-параметр або 5-параметр крива рекомендується.
3. Обчислити середню оптичну густину кожного невідомого дубліката.
4. Прочитайте значення невідомих безпосередньо зі стандартної кривої.
5. Якщо зразок зчитує більше 100 нг / мл, розбавте його буфером аналізу при розведенні не більше ніж 1: 8. Отриманий результат слід помножити на коефіцієнт розведення.

ТИПОВІ ТАБЛИЧНІ ДАНІ:

Зразок даних лише. Не використовуйте для розрахунку результатів.

СТАНДАРТ	ОГ1	ОГ2	СЕРЕДНЯ ОГ	ЗНАЧЕННЯ (нг/мл)
A	0,073	0,070	0,072	0
B	0,102	0,100	0,101	1
C	0,290	0,293	0,292	5
D	0,620	0,630	0,625	10
E	1,140	1,086	1,113	20
F	1,947	1,919	1,933	50
G	2,518	2,514	2,516	100
НЕВІДОМИЙ	0,275	0,273	0,274	4,22

ТИПОВА СТАНДАРТНА КРИВА



ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

Чутливість

Межа виявлення (МВ) для Лептин становить 0,50 нг / мл, як визначено за допомогою протоколу NCCLS та з пропорцією помилкових позитивів (α) менше ніж 5% і помилкових негативів (β) менше ніж 5%; на основі 82 порожніх визначень; МВ = 0,42 нг / мл.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ (перехресна реактивність)

Наступні речовини були перевірені на рівні 1000 нг / мл та не виявлено перехресних реакцій:
Мишачій лептин, TNF-α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-16, GM-CSF , CSF та EGF.

ТОЧНІСТЬ В АНАЛІЗІ

Чотири зразка сироватки аналізували двадцять разів кожна на тій же стандартній кривій. Результати (в нг / мл) наведені в таблиці нижче:

зразок	середнє	СВ	**CV%**
1	2,45	0,09	3,7
2	7,94	0,34	4,3
3	11,67	0,64	5,5
4	27,51	1,37	5,0

ТОЧНІСТЬ МІЖ АНАЛІЗАМИ

Чотири зразки аналізували десять разів протягом десяти днів. Результати (в нг / мл) наведені нижче:

ЗРАЗОК	середнє	СВ	**CV%**
1	2,71	0,16	5,9
2	8,24	0,48	5,8
3	12,01	0,82	6,8
4	24,98	1,45	5,8

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

Збагачені зразки готували шляхом додавання визначених кількостей лептіну до трьох зразків сироватки пацієнта. Результати (в нг / мл) наведено нижче:

зразок	спостережуваний	очікуваний	% відтворюваність
1 незбагачений	3,89	-	-
+3,06	6,28	6,95	90,4
+8,06	10,98	11,95	91,9
+23,06	25,43	26,95	94,4
2 незбагачений	7,89	-	-
+1,06	8,82	8,95	98,5
+6,06	15,03	13,95	107,7
+21,06	30,32	28,95	104,7
3 незбагачений	11,61	-	-
+4,2	15,71	15,81	99,4
+12,8	25,42	24,41	104,1
+29,46	41,18	41,07	100,3

ЛІНІЙНІСТЬ

Три зразки сироватки пацієнтів були серійно розведені буфером аналізу лептину. Результати (в нг / мл) наведено в таблиці нижче:

зразок	спостережуваний	очікуваний	% відтворюваність
1 1:2 1:4 1:8	3.03 1.42 0.71 0.35	- 1,52 0,76 0,38	- 93,4 93,4 92,1
2 1:2 1:4 1:8	11.27 5.93 3.05 1.35	- 5,64 2,82 1,41	- 105,1 108,2 95,7
3 1:2 1:4 1:8	27.91 14.91 6.74 3.29	- 13,96 6,98 3,49	- 106,8 96,6 94,3

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

ІФА Лептин (LDN) порівнювався з комплектом EIA для провідного конкурента Лептин (набір X). Тридцять вісім зразків сироватки від 1,05 до 75,62 нг / мл аналізували обома наборами, даючи наступні результати:

Регресія: набір X = 0.9644 (лептин ІФА) + 1.5489

г = 0,98,

комплект X середнє: 21,13,

лептин ІФА середнє: 20,30

Очікувані нормальні значення

Що стосується всіх клінічних аналізів, то кожна лабораторія повинна збирати дані та встановлювати власний діапазон очікуваних нормальних значень

група	Середнє (нг/мл)	Діапазон (нг/мл)
жінки	7,4	3,7-11,1
чоловіки	3,8	2,0-5,6

Значення лептину в жінок приблизно в 2,5 рази вище, ніж у чоловіків на одиницю BMI.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dagogo-Jack S, et al. Plasma Leptin and Inulin Relationships in Obese and Nonobese Humans. Diabetes. 1996; 45(5):695–8.
2. Chessler SD, et al. Increased Plasma Leptin Levels Are Assosciated with Fat Accumulation in Japanese Americans. Diabetes. 1998; 47(2):239–43.
3. Heymsfi eld SB, et al. Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults: A Randomized, Controlled, Dose- Escalation Trial. JAMA. 1999; 282(16):1568–75.
4. Wiesner G, et al. Leptin is Released from the Human Brain: Infl uence of Adiposity and Gender. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(7):2270–4.
5. Quinton ND, et al. Leptin Binding Activity Changes With Age: The Link Between Leptin and Puberty. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(7):2336–41.
6. Considine R, et al. Serum Immunoreactive Leptin Concentration in Normal-Weight and Obese Humans. N Engl J Med. 1996; 334:292–95.
7. Maffei M, et al. Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Level Leptin and obRNA in Obese and Weight Reduced Subjects. Nat Med. 1995; 1(11):1155–61.
8. Tamura T, et al. Serum Leptin Concentrations During Pregnancy and Their Relationship to Fetal Growth. Obstet Gynecol. 1998; 91(3):389–95.
9. Matsuda J, et al. Serum Leptin Concentration in Cord Blood:Relationship to Birth Weight and Gender. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(5):1642–4.
10. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol Obstet Invest. 1995; 40(2): 139–40.

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

Температура зберігання	Виробник	Містить достатньо <N> випробувань
Дата закінчення терміну придатності	**LOT** Код партії	**IVD** Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
Зверніться до інструкції з використання	**CONT** Зміст	Маркування
Небезпека	REF Каталожний номер	RUO тільки для дослідницьких цілей