

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ЗАО «БиохимМед»

Валид Н.Е.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению реагентов диагностических к Анализатору для оценки окислительного стресса, модели FormPlus 3000; Form Oх (с Приложением №1).

Производства: Callegari S.P.A., (Каллегари С.П.А., Италия)

Parma (PR) Via Adamello 2/A 43100,

Tel. 0521/273274

список реагентов:

1. Гемоглобин (Haemoglobin PHARMAEMOG).
2. Гематокрит (Hematocrit PHARMAEMAT).
3. Мочевая кислота (Uric Acid PHARMA ACIDUR)
4. Свободные радикалы FORT (FORT (Free Oxygen Radicals Testing))
5. Антиоксидантная способность FORD (FORD (Free Oxygen Radicals Defence))

1. Анализ FORD (устойчивость к окислению)

Принцип метода

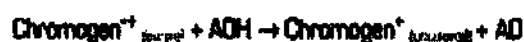
Метод FORD основан на использовании предварительно образованных радикалов и снижении абсорбции, которое пропорционально концентрации антиоксидантов в крови⁵. в присутствии кислого буфера (pH=5.2) и подходящего оксиданта (FeCl₃) аминопроизводное (хромоген) образует стабильный окрашенный продукт, катион, определяемый фотометрически при длине волны 505 нм (реакция 1).

Антиоксиданты (АОН), присутствующие в образцах, снижают содержание катионов, что приводит в конечном итоге к обесцвечиванию раствора, пропорционально количеству АО в образце (реакция 2).

Реакции:



(unreacted)



Исследуемые образцы

Цельная кровь

Реагенты

Набор для 30 определений (кат. № AD-12136) содержит:

- 3 упаковки по 10 шт. реагента C1: одноразовые кюветы с квадратным основанием, содержащие хромоген в твердом виде.
- 1 упаковка по 30 шт. реагента S1 (одноразовые пробирки эппендорф, содержащие буфер).
- 1 упаковка по 30 шт. реагента S2 (одноразовые пробирки эппендорф с голубой маркировкой, содержащие стабилизированный буфер с консервантами, pH 5.2).
- 3 упаковки по 10 шт. реагента C1 (одноразовые кюветы с квадратным основанием, содержащие хромоген в твердом виде).
- 1 стеклянный флакон, содержащий раствор S3 (оксидант).
- Пипетки для пипетирования 50 мкл образца.
- 1 пластиковый пакет, содержащий одноразовые наконечники для пипеток
- Капилляры.

Подготовка реагентов

Все реагенты готовы к использованию.

Хранение и стабильность

Реагенты хранятся при комнатной температуре (15-30°C), тщательно закрытыми, в соответствующем пакете из алюминиевой фольги.

Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Стандарт

Контрольная сыворотка (FORD CONTROL, AD-12035) с референсным значением доступна по запросу.

Процедура метода

Разработана максимально дружелюбная для пользователя процедура тестирования. Кроме того, в процессе анализа на дисплее высвечиваются рекомендации по выполнению теста.

Для упрощения протокола процедура теста FORD разделена на три этапа:

A. Первое считывание (абсорбция хромогена)

1. Вылейте содержимое S2 в новую кювету C1 с хромогеном и внесите 50 мкл реагента S3 с помощью пипетки, поставляемой в наборе.
2. Аккуратно покачайте несколько секунд.
3. Поместите кювету в лунку считывания, анализ начнется автоматически.
4. Первое считывание выполняется через 4 минуты.
5. Достаньте кювету.

В. Подготовка образцов крови (супернатант)

6. Соберите образец капиллярной крови, используя капилляры на 50 мкл, поставляемые с набором.

7. Перенесите образец крови в пробирку S1.

8. Аккуратно перемешайте

9. Центрифугируйте 1 минуту при 3500 rpm.

Прозрачная жидкость, образовавшаяся после центрифугирования над осевшим материалом, называется супернатант. Супернатант – это материал (образец), который используется для тестирования.

Второе считывание (Sample Absorbance)

10. Внесите дважды по 50 мкл образца (полученного, как описано в шаге В), используя пипетку, поставляемую в наборе, в кювету C1 (в которой уже выполнено первое считывание в шаге А)

11. Аккуратно покачайте несколько раз.

12. Немедленно поместите кювету в лунку считывания; тестирование автоматически продолжится.

13. Второе считывание выполняется через 2 минуты

14. Результаты будут показаны на дисплее и автоматически сохранены.

Замечание

- Меняйте наконечник пипетки при каждом использовании пипетки.

- Правильно уравнивайте центрифугу перед центрифугированием.

- После окончания центрифугирования аккуратно достаньте пробирку, не допуская встряхивания или соударения с другими предметами, для предотвращения всплывания осажденных эритроцитов.

- Так как реакция между хромогенным радикалом и антиоксидантами образца происходит мгновенно, то кювету необходимо поместить в лунку считывания сразу же после внесения образца.

- При отборе супернатанта не прикасайтесь наконечником пипетки к эритроцитам на дне пробирки.

Результаты

Считывание результатов теста FORD основано на ослаблении окрашивания, которое пропорционально концентрации антиоксидантов в образце. Первое считывание выполняется через 4 минуты, второе считывание – через 2 минуты. Конечный результат представляет собой разницу между двумя считываниями. Значение абсорбции затем автоматически преобразуется в эквиваленты тролокса (ммоль/л), 2,5,7,8-тетраметил-2(2'-карбоксиэтил)-6-гидроксихроман, производного витамина Е, вещества с сильными антиоксидантными свойствами, основываясь на калибровочной кривой, хранящейся в анализаторе.

Референсные значения: 1.07 – 1.53 ммоль/л эквивалентов тролокса

Обзор тестов, выполняемых с помощью анализатора FORM Oх

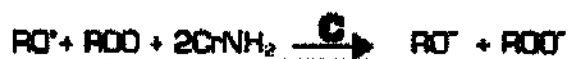
Тест	Объем образца	Процедура
FORT	20 мкл	Соберите кровь, используя капилляр. Поместите капилляр в реагент R2 и аккуратно покачайте. Вылейте содержимое в реагент R1 и аккуратно покачайте. Центрифугируйте 1 минуту. Поместите кювету в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 6 минут.
FORD	50 мкл	Вылейте содержимое S2 в C1, внесите 50 мкл S3 и аккуратно покачайте. Поместите C1 в лунку считывания. Подождите 4 минуты до первого считывания. В то же время соберите кровь и внесите в пробирку S1. Центрифугируйте 1 минуту. Внесите 100 мкл супернатанта в активированную C1 и аккуратно покачайте. Поместите еще раз C1 в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 2 минуты.

2. Анализ FORT (определение свободных радикалов)

Принцип метода

Тест FORT является колориметрическим тестом, основанным на способности переходных металлов, таких, как железо, катализировать расщепление гидропероксидов (ROOH), с образованием свободных радикалов (реакция 1-2). Эти радикалы затем захватываются аминопроизводным, C_6NH_2 . Амин взаимодействует со свободными радикалами, с образованием окрашенного стабильного продукта, определяемого фотометрически при длине волны 505 нм (реакция 3). Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству радикалов и концентрации гидропероксидов, и, соответственно, окислительному статусу образца.

Реакции



Исследуемые образцы

Цельная кровь

Реагенты

Набор для 30 определений (кат. № AD-12107) содержит:

- 3 упаковки по 10 шт. реагента R1 (одноразовые кюветы с квадратным основанием содержащие хромоген в твердом виде).
- 1 упаковка по 30 шт. реагента R2 (одноразовые пробирки эппендорф, содержащие стабилизированный буфер с консервантами, pH 4.8).
- Капилляры объемом на 20 мкл

Подготовка реагентов

Все реагенты готовы к использованию.

Хранение и стабильность

Реагенты хранятся при комнатной температуре (15-30°C), тщательно закрытыми, в соответствующем пакете из алюминиевой фольги.

Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Стандарт

Контрольная сыворотка (FORT CONTROL, кат. № AD-12028) с референсным значением доступна по запросу.

Процедура метода

Разработана максимально дружелюбная для пользователя процедура тестирования. Кроме того, в процессе анализа на дисплее высвечиваются рекомендации по выполнению теста.

1. Соберите образец капиллярной крови, используя капилляр на 20 мкл, поставляемый с набором
2. Удалите излишки крови с капилляра.
3. Поместите капилляр в пробирку R2.
4. Аккуратно покачайте из стороны в сторону, пока кровь полностью не вытечет из капилляра
5. Вылейте содержимое пробирки в кювету R1 и покачайте несколько секунд
6. Поместите кювету в центрифугу и центрифугируйте в течение 1 минуты при приблизительно 3500 rpm
7. Поместите кювету в лунку считывания и тестирование начнется автоматически
8. Результаты будут показаны на дисплее через 6 минут и автоматически сохранены.

Замечания

- Поместите кювету в центрифугу одной из ребристых сторон вверх.
- Убедитесь, что капилляр направлен под углом к ребристым сторонам кюветы и не мешает прохождению луча.

Результаты

Считывание результатов теста FORT основано на линейной кинетической реакции и выполняется первый раз через 3 минуты и повторно еще через 3 минуты. Конечный результат представляет собой разницу между двумя считываниями. Значение абсорбции затем автоматически преобразуется в условные единицы, называемые единицы FORT, или в эквивалентную концентрацию H_2O_2 , основываясь на калибровочной кривой, хранящейся в анализаторе.

1 Единица FORT соответствует приблизительно 7.6 мкмоль/л (или 0.26 мг/л) H_2O_2 .

Референсные значения: до 310 единиц FORT, что соответствует приблизительно 2.35 ммоль/л H_2O_2

Рекомендации по интерпретации результатов FORT

Более высокому результату теста соответствует более высокий уровень гидропероксидов, и соответственно, большая степень окислительного повреждения свободными радикалами.

При получении результата выше референсного значения пользователь должен проконсультироваться с квалифицированными специалистами-медиками (профессионалами, которые могут порекомендовать необходимые изменения образа жизни питания, supplementation или выполнить другие необходимые клинические исследования).

Замечания

Всегда сопоставляйте полученный результат с индивидуальным референсным значением (предыдущем результатом). Отмечайте любые значительные изменения, которые могут потом быть оценены врачом.

3. Гематокрит

Клиническое значение

В человеческой крови содержатся эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Определения уровня гематокрита может дать общее представление о способности крови переносить кислород. Гематокрит — объемная фракция эритроцитов в цельной крови (соотношение объемов эритроцитов и плазмы), которая зависит от количества и объема эритроцитов, и выражается в процентах. Анализ выполняется при анемии или других гематологических заболеваниях, для оценки эритропоэза (биологического процесса образования эритроцитов), особенно в сочетании с гемоглобином. Любая активность, снижающая уровень кислорода в крови, будет вызывать усиление эритропоэза, и, соответственно, повышение гематокрита. Как переносчики кислорода, эритроциты должны постоянно блокировать окислительный стресс. Нарушение баланса окислительного повреждения и антиоксидантной защиты описано при многих гематологических заболеваниях.

Принцип метода

С помощью специфического буферного раствора приготавливают стабильную однородную суспензию эритроцитов. Мутность этой суспензии коррелирует со значением гематокрита образца.

Исследуемые образцы

Цельная кровь.

Реагенты

Набор для 10 определений (кат. № AD-12102) содержит:

1 упаковку, 10 шт., одноразовые кюветы с квадратным основанием, содержащие буфер. Капилляры на 10 мкл.

Подготовка реагентов

• Все реагенты готовы к использованию.

Хранение и стабильность

• Реагенты хранятся при комнатной температуре (15-30°C), тщательно закрытыми, в соответствующем пакете из алюминиевой фольги. Срок годности кювет после вскрытия упаковки указан на упаковке. Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Процедура метода

Разработана максимально дружелюбная для пользователя процедура тестирования. Кроме того, в процессе анализа на дисплее высвечиваются рекомендации по выполнению теста.

Для проведения анализа выполните следующие шаги:

Бланкируйте прибор, установив поставляемую кювету, без крови, в лунку считывания.

Выньте кювету

Соберите капиллярную кровь, используя поставляемые в наборе капилляры на 10 мкл

Удалите излишки крови с капилляра.

Внесите кровь в кювету.

Покачайте несколько раз, так, чтобы вся кровь вышла из капилляра.

Поместите кювету в лунку считывания, анализ начнется автоматически.

Через несколько секунд результаты будут показаны на дисплее и автоматически сохранены.

Замечание

- Убедитесь, что бланкирование было выполнено с использованием кюветы, не содержащей кровь.

- После внесения образца немедленно поместите кювету в лунку считывания.

Результаты

Значения гематокрита обычно выражаются в процентах, как в общепринятой, так и в Международной системе единиц измерения.

Референсные значения:

Мужчины: 40 - 54% Женщины: 37 - 47%.

4. Гемоглобин

Клиническое значение

Гемоглобин является основным белком эритроцитов, которые переносят кислород от легких в ткани организма, и углекислый газ (CO_2) – обратно в легкие, для выдыхания. Он дает крови красный цвет. И высокий, и низкий уровни гемоглобина указывают на нарушения баланса эритроцитов в крови, на возможную патологию. Тест часто выполняется с целью выявления и мониторинга тяжести анемий различной этиологии, или разрушения эритроцитов, особенно в сочетании с гематокритом. Анемия включает различные состояния приводящие к одному результату: транспорт кислорода в организме снижен по сравнению с нормой, и, следовательно, пациент с анемией получает недостаточно кислорода.

Принцип метода

Гемоглобин высвобождается из эритроцитов при добавлении образца в лизирующий буфер. Интенсивность окрашивания получающегося раствора прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в образце.

Исследуемые образцы

Цельная кровь.

Реагенты

Набор для 10 определений (кат. № AD-12006) содержит:

1 упаковку, 10 шт., одноразовые кюветы с квадратным основанием, содержащие буфер.
Капилляры на 10 мкл.

Подготовка реагентов

Все реагенты готовы к использованию.

Хранение и стабильность

Реагенты хранятся при комнатной температуре ($15-30^\circ\text{C}$), тщательно закрытыми, в соответствующем пакете из алюминиевой фольги. Срок годности кювет после вскрытия упаковки указан на упаковке. Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Процедура метода

Разработана максимально дружелюбная для пользователя процедура тестирования. Кроме того, в процессе анализа на дисплее высвечиваются рекомендации по выполнению теста.

Для проведения анализа выполните следующие шаги:

Бланкируйте прибор, установив поставляемую кювету, без крови, в лунку считывания.

Выньте кювету

Соберите капиллярную кровь, используя поставляемые в наборе капилляры на 10 мкл

Удалите излишки крови с капилляра.

Внесите кровь в кювету.

Покачайте несколько раз, так, чтобы вся кровь вышла из капилляра.

Поместите кювету в лунку считывания, анализ начнется автоматически.

Через несколько секунд результаты будут показаны на дисплее и автоматически сохранены.

Замечание

-Убедитесь, что бланкирование было выполнено с использованием кюветы, не содержащей кровь.

-После внесения образца немедленно поместите кювету в лунку считывания.

Результаты

Концентрация гемоглобина может быть выражена либо в общепринятых единицах измерения: г/дл, либо в Международных единицах ммоль/л [Hb/4].

Референсные значения:

Мужчины: 14.0 - 18.0 г/дл (соответствует 8.75 - 11.25 ммоль/л [Hb/4])

Женщины: 12.0 - 16.0 г/дл (соответствует 7.5 - 10 ммоль/л [Hb/4]).

5. Мочевая кислота

Клиническое значение

Мочевая кислота является продуктом метаболизма пуринов. Пурины - соединения, входящее в состав пуриновых оснований нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). Практически все пурины поступают с пищей. Большая часть мочевой кислоты выводится с мочой. Мочевая кислота плохо растворима в воде и легко преципитирует, с образованием иглоподобных кристаллов урата натрия. Это способствует образованию камней в почках и вызывает сильные боли при накоплении в суставах. Это может происходить либо из-за повышения продукции мочевой кислоты, вызванного употреблением некоторых продуктов, например, морепродуктов, моллюсков, или, чаще, из-за неспособности почек адекватно удалять мочевую кислоту. Состояния при повышенном уровне мочевой кислоты называют гиперурикемия. Определение концентрации мочевой кислоты в крови может помочь в оценке риска развития многих заболеваний, диагностике и мониторинге терапии подагрического артрита или почечнокаменной болезни. Гиперурикемия также является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, повышенный уровень мочевой кислоты должен настораживать врача.

И, наконец, благодаря своей способности выполнять функцию ловушки свободных радикалов, мочевая кислота в нормальной концентрации может рассматриваться как антиоксидант.

Принцип метода

Мочевая кислота окисляется до аллантоина и перекиси водорода (H_2O_2) в присутствии фермента уриказы (реакция 1). Перекись водорода взаимодействует с 4-аминоантипирином и фенольное производное в присутствии пероксидазы (POD) образует продукт красного цвета (реакция 2). Интенсивность окрашивания при длине волны 505 нм прямо пропорциональна концентрации мочевой кислоты в образце.

Реакции:

1. Uric Acid $\xrightarrow{\text{URICASE}}$ allantoin + H_2O_2
2. H_2O_2 + 4-aminoantipyrine + phenol derivative $\xrightarrow{\text{POD}}$ red coloured compound + H_2O

Исследуемые образцы

Цельная кровь.

Реагенты

Набор для 10 определений (кат. № AD-12007) содержит:

- 1 упаковку, 10 шт., одноразовые кюветы с квадратным основанием, содержащие буфер.
- 1 флакон с капельницей, содержащий фермент.
- Наконечники для дозаторов

Подготовка реагентов

Все реагенты готовы к использованию.

Хранение и стабильность

Реагенты хранятся при комнатной температуре (15-30°C), тщательно закрытыми, в соответствующем пакете из алюминиевой фольги. Срок годности кювет после вскрытия у паковки указан на упаковке. Храните ферменты при 2-8°C. Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Процедура метода

Разработана максимально дружественная для пользователя процедура тестирования. Кроме того, в процессе анализа на дисплее высвечиваются рекомендации по выполнению теста.

Для проведения анализа выполните следующие шаги:

Бланкируйте прибор, установив поставляемую кювету, без крови, в лунку считывания.

Выньте кювету

Соберите капиллярную кровь, используя поставляемые в наборе капилляры на 10 мкл

Удалите излишки крови с капилляра.

Внесите кровь в кювету.

Покачайте несколько раз, так, чтобы вся кровь вышла из капилляра.

Поместите кювету в лунку считывания, анализ начнется автоматически.

Через несколько секунд результаты будут показаны на дисплее и автоматически сохранены.

Замечания

-Меняйте одноразовые наконечники каждый раз, когда используете пипетку.

-Используйте соответствующую кювету для балансировки при центрифугировании.

-После окончания центрифугирования аккуратно достаньте пробирку, не допуская встряхивания или соударения с другими предметами, для предотвращения всплывания осадка.

-Проверяйте вносимое количество капель фермента.

-Убедитесь, что бланкирование выполнено после внесения фермента в кювету.

Результаты

Концентрация мочевой кислоты может быть выражена либо в общепринятых единицах измерения: мг/дл, либо в Международных единицах: ммоль/л.

Референсные значения:

Мужчины: 2.0 - 7.0 мг/дл (соответствует 0.12 - 0.42 ммоль/л)

Женщины: 2.0 - 6.0 мг/дл (соответствует 0.12 - 0.36 ммоль/л).

Обзор тестов, выполняемых с помощью анализатора FORM Plus

Тест	Объем образца	Процедура
FORT	20 мкл	Соберите кровь, используя капилляр. Поместите капилляр в реагент R2 и аккуратно покачайте. Вылейте содержимое в реагент R1 и аккуратно покачайте. Центрифугируйте 1 минуту. Поместите кювету в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 6 минут.
FORD	50 мкл	Вылейте содержимое S2 в C1, внесите 50 мкл S3 и аккуратно покачайте. Поместите C1 в лунку считывания. Подождите 4 минуты до первого считывания. В то же время соберите кровь и внесите в пробирку S1. Центрифугируйте 1 минуту. Внесите 100 мкл супернатанта в активированную C1 и аккуратно покачайте. Поместите еще раз C1 в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 2 минуты.
Гемоглобин	10 мкл	Бланкируйте. Соберите кровь, используя капилляр. Поместите капилляр в кювету и аккуратно покачайте. Поместите кювету в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 1 минуту.
Гематокрит	10 мкл	Бланкируйте. Соберите кровь, используя капилляр. Поместите капилляр в кювету и аккуратно покачайте. Поместите кювету в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 10 секунд.
Мочевая кислота	50 мкл	Внесите фермент в кювету и аккуратно покачайте. Бланкируйте. Соберите кровь и влейте в кювету, аккуратно покачайте. Центрифугируйте 2 минуты. Поместите кювету в лунку считывания. Результат будет выведен на экран и сохранен через 2 минуты.