

УТВЕРЖДЕНА

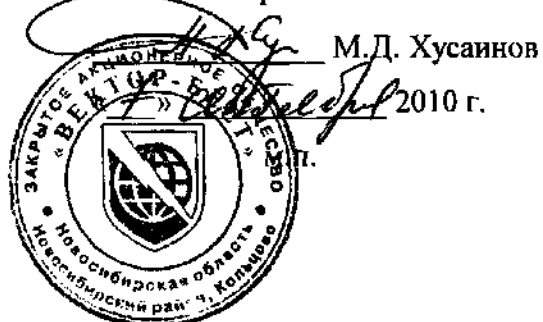
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови

(Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ предназначен для определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Эритропоэтин (ЭПО) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 30,4 кДа и принадлежит к семейству цитокинов, т.е. гормоноподобных иммуномодуляторов, играющих роль межклеточных медиаторов при иммунном ответе и многих других физиологических и патологических реакциях в организме. В организме человека ЭПО образуется преимущественно в почках, отчасти в печени (10–15% общей продукции). ЭПО является одним из центральных регуляторов образования эритроцитов в организме человека и животных, первичным медиатором нормальной физиологической реакции на гипоксию. Основная особенность ЭПО – контроль пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников эритроидного ряда.

Уровень эритропоэтина повышается у больных, страдающих апластической анемией, миелодиспластическим синдромом, железодефицитными анемиями (вызванными воздействием цитотоксических агентов типа азидотимидина), врожденными сердечными патологиями, при вторичных полицитемиях (например, гипоксии на больших высотах, хронических обструктивных заболеваниях легких, легочном фиброзе), при эритропоэтин-продуцирующих опухолях (например, гемангиобластомах мозжечка, феохромоцитомах, опухолях почек), во

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД Т.И. Колочевой.

A handwritten signature in dark ink, located in the bottom right corner of the page.

время беременности, при поликистозе почек, после умеренного кровотечения у здорового человека. Снижение уровня эритропоэтина наблюдается у лиц с почечной недостаточностью, лиц, находящихся на гемодиализе, при миеломной болезни, при первичных полицитемиях.

1.3. Количественное определение концентрации эритропоэтина в сыворотке крови позволяет проводить дифференциальную диагностику анемий, дифференциальную диагностику полицитемий и мониторинг при использовании рчЭПО в качестве лекарственного препарата.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов и 1 пробы контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета) или 27 неизвестных, 18 калибровочных и 3 проб контрольных образцов (при трех независимых постановках анализа).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии калибровочные образцы с известной концентрацией эритропоэтина и исследуемые образцы инкубируются в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными поликлональными антителами к эритропоэтину. На второй стадии, связавшийся в лунках эритропоэтин обрабатывают конъюгатом моноклональных антител к эритропоэтину. После удаления избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные поликлональные антитела – эритропоэтин – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). Степень окраски пропорциональна концентрации эритропоэтина в анализируемых образцах.

После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация эритропоэтина в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности поликлональными антителами к эритропоэтину, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта ВОЗ 2nd International Standard for Erythropoietin, Recombinant (88/574), содержащие известные количества эритропоэтина – 0; 2; 10; 50; 100; 200 мМЕ/мл; концен-

трации эритропоэтина в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7 мл);

- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием эритропоэтина, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);

- конъюгат моноклональных антител к эритропоэтину с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,4 мл);

- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12,0 мл);

- раствор для разведения конъюгата (PPK) – 1 флакон (13,0 мл);

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);

- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);

- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);

- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;

- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;

- ванночкой для реагентов – 2 шт.;

- наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. В наборе «Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ» используются поликлональные и моноклональные антитела с высокой специфичностью к эритропоэтину, что позволяет исключить проблему перекрестной реакции с другими белками, такими как сывороточный альбумин, гемоглобин, трансферрин, альфафетопротеин.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания эритропоэтина в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации эритропоэтина при разведении анализируемых проб сывороткой крови, не содержащей эритропоэтин, не превышает 10% в диапазоне концентраций: 2–200 мМЕ/мл.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации эритропоэтина, предписанной в образце, полу-

ченной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 10 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация эритропоэтина не превышает 0,5 мМЕ/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация эритропоэтина, измеренная в сыворотке крови, взятой у 120 здоровых мужчин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 25-50 лет, у 100 здоровых женщин в возрасте 20–45 лет составила 4,5 – 30,0 мМЕ/мл. Статистических различий в мужской и женской частях популяции не обнаружено.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации эритропоэтина, соответствующие нормальным у здоровых людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс I (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;

– промывочное устройство для планшетов;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 500 мл;

– колбы вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 5 сут или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18-25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18-25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами и контрольным образцом встряхнуть или центрифугировать на микроцентрифуге так, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно. Затем содержимое флаконов тщательно перемешать пипетированием, избегая вспенивания.

После отбора части содержимого тщательно закупоренные флаконы хранить при температуре 2-8 °С не более 1 мес.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата конъюгата и раствора для разведения конъюгата за 5-10 мин до окончания первой инкубации. Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18-25 °С.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата тетраметилбензидина и субстратного буферного раствора за 5-10 мин до окончания второй инкубации. Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18-25 °С в защищенном от света месте.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	0,2	1,8	0,1	2,0	4,0	96
4	0,4	3,6	0,2	4,0	8,0	192
6	0,6	5,4	0,3	6,0	12,0	288
8	0,8	7,2	0,4	8,0	16,0	384
10	1,0	9,0	0,5	10,0	20,0	480
12	1,2	10,8	0,6	12,0	24,0	576

7.7. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток.

7.8. Внести в соответствующие лунки в дублях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 45 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз рабочим промывочным раствором (п. 7.3). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре $18-25^\circ\text{C}$.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.14. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. онт. плотн.) от заданной концентрации эритропозтина в калибровочных образцах (мМЕ/мл).

9.2. Определить содержание эритропозтина в контрольном образце и анализируемых пробах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация эритропозтина в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 200 мМЕ/мл, образец повторно анализируют после дополнительного разведения раствором для разведения сывороток, полученный результат умножают на коэффициент разведения (2, 4, 8 и т.д.).

9.4. Для представления результатов измерения концентрации эритропозтина в пг/мл значения, полученные в мМЕ/мл, умножают на коэффициент пересчета 8 (1 мМЕ/мл ЭПО = 8 пг/мл ЭПО).

9.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации эритропозтина в контрольном образце.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Эритроноэтин – ИФА – БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности (14 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С не более 1 мес;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 18–25 °С не более 3 ч;

- промывочный раствор можно хранить при температуре 2–8 °С не более 5 сут;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре 18–25 °С не более 3 ч.

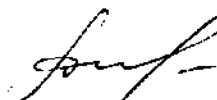
10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора Эритроноэтин – ИФА – БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:
117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

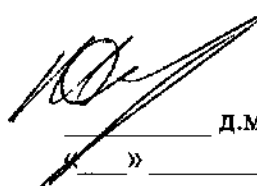
Ст. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

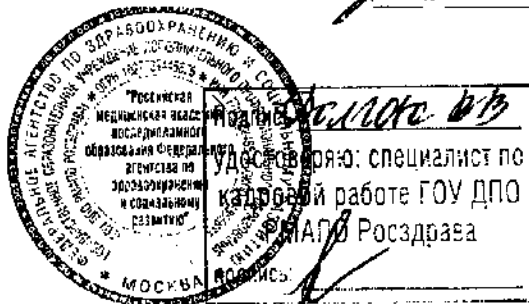
 Т.И. Колочева

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

 д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 20__ г.







Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
двадцать листов

Handwritten signature