

Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения инсулин-подобного фактора
IGF-I – ELISA.

Производитель: «Медиagnost ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Высокая специфичность для IGF-I
- Точное определение уровня IGF-I в образцах, без экстракции. Не требуется никакого физического разделения IGF-I и IGF-связывающих белков.
- Отсутствует интерференция IGF-связывающих белков за счет избытка IGF-II.
- Калибровка в соответствии с международными референсными стандартами, одобренными ВОЗ (WHO NIBSC 02/254).
- Использование набора позволяет получать точные абсолютные значения уровней IGF-I - извлечение 98,7%.
- Точное измерение очень низких концентраций IGF-I: чувствительность 0.09 нг/мл.
- Для анализа требуется небольшой объем образца, что позволяет проводить его у маленьких детей.

клинического использования необходимо только одно разведение.

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 6,8% и 6,7%, соответственно.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ОБЩЕЕ

Инсулин – подобные факторы роста (IGFs) I и II типов регулируют пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, клеточную адгезию и ангиогенез в различных тканях и типах клеток (1-3). IGF-I идентичен соматомедину (Sm-C) и имеет молекулярную массу 7649 Да (5). Основными регуляторами синтеза IGF-I является соматотропин (гормон роста, GH) и прием пищи (6), хотя в некоторых тканях на его действие оказывает влияние множество других тропных гормонов и пептидных факторов роста. В отличие от других пептидных гормонов, IGFs тесно связаны со специфическими связывающими белками (IGFBP). В настоящее время известно семь видов IGFBPs (7,8,22), которые с одинаковой афинностью связываются и с IGF-I, и с IGF-II, либо более активно связываются IGF-II (9,10). Основной проблемой при определении уровней IGF-I является влияние IGFBPs на результаты анализа. Прямое определение IGFs в нативных образцах сыворотки крови (11) может дать ложные результаты из-за чрезвычайно малой диссоциации комплекса IGF-I/IGFBP-3 при проведении анализа.

Влияние IGFBPs зависит от отношения содержания IGF-I/IGFBP в тестируемых образцах (в качестве примера см. рисунок 1).

Поэтому перед измерением использовались различные методы, позволяющие физически отделять IGF-I от его связывающих белков, включая (а) хроматографию в кислых условиях, (б) твердофазную экстракцию и (с) кислотно - спиртовую экстракцию (2,12,13). Однако, данные методы либо неудобны для рутинного применения в клинко-лабораторной практике, либо трудоемки и длительны, либо не обеспечивают адекватной экстракции.

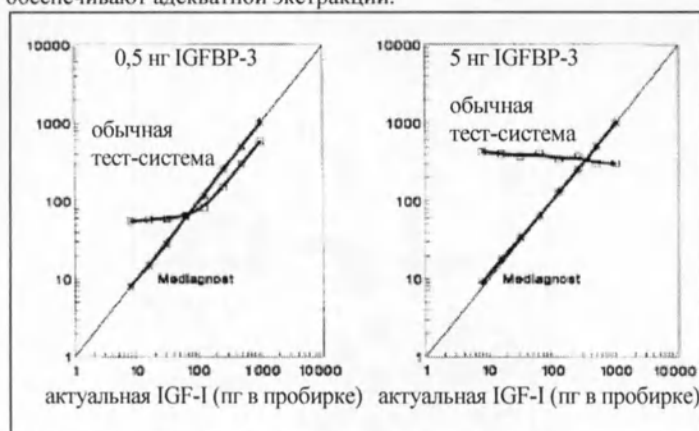


Рисунок 1. Интерференция IGFBP при определении IGF-I. Известные концентрации IGF-I были измерены при наличии IGFBP-3 в концентрации 0,5 нг (слева) или 5 нг (справа) при использовании обычной тест-системы (□) и тест системы с блокированием IGFBP (*).

Наиболее широко используется метод кислотно - спиртовой экстракции (13,14) с экстракцией только 70-80 % связанного с IGFBP IGF-I. Это приводит к получению ложно заниженных результатов анализа (15). Экстракция не обеспечивает полноценного удаления IGFBPs и приводит к снижению чувствительности анализа из-за предварительного разведения тестируемых образцов при экстракции. Более того, неэкстрагированный IGFBP может оказывать существенное влияние на результаты анализа. Также кислотно - спиртовую экстракцию нельзя использовать при тестировании других образцов, кроме сыворотки или плазмы крови (например, культуральной среды), в которых определение IGF-I является достаточно трудным вследствие избытка IGFBPs. Чтобы избежать этих трудностей, была разработана простая тест-система, в которой не требуется проведения подготовки образцов перед тестированием.

Помимо гормона роста, существует много других факторов, влияющих на уровень IGF-I в сыворотке крови. Снижение уровня IGF-I обнаружено при таких состояниях как нарушение питания, мальабсорбция, гипотиреоз, заболевания печени, некорректируемый сахарный диабет, хронические воспалительные заболевания (1,6), злокачественные новообразования множественные травмы. Напротив, высокие уровни IGF-I обнаружены у пациентов с преждевременным половым созреванием или ожирением. Для правильной интерпретации полученных результатов измерения IGF-I необходимо учитывать влияние возраста. Конечно, использование общего порогового (cut-off) уровня и референсных значений для всех возрастных групп является неадекватным, особенно у детей и подростков. Так как существует связь уровней IGF-I с уровнями гормона роста, определение содержания IGF-I в сыворотке крови может быть полезным для диагностики нарушений роста, особенно при дефиците гормона роста или акромегалии (6,16-19,23,24). Основным преимуществом определения уровня IGF-I в сравнении с определением уровня гормона роста является наличие стабильных концентраций в течение суток, поэтому достаточно всего лишь однократного измерения. Следовательно, определение IGF-I должно быть первым в серии лабораторных тестов. Наличие нормальных уровней IGF-I свидетельствует об отсутствии нарушений системы гормон роста / IGF-I. При низком содержании IGF-I (то есть, близко или ниже соответствующего возрастного 5% перцентиля) необходимо проведение дальнейших диагностических процедур. При исключении влияния других факторов, приводящих к снижению уровня синтеза IGF-I (например, недоедание или нарушение функции печени), снижение IGF-I свидетельствует о снижении уровня синтеза гормона роста. Для проведения дифференцировки здоровых низкорослых детей без дефицита гормона роста и детей с "классическим" дефицитом гормона роста, использование 0,1 перцентиля IGF-I является адекватным, особенно у детей старше восьми лет. Однако, уровни IGF-I у низкорослых детей без дефицита гормона роста могут находиться в диапазоне 0,1 - 5 перцентиль (19). Напротив, наличие акромегалии у пациентов связано с существенным повышением уровней IGF-I. Очевидно, степень повышения уровней IGF-I лучше отражает тяжесть заболевания, чем уровни гормона роста (17,18,20).

Использование для исследовательских целей

IGF-I в низких концентрациях присутствует в различных жидкостях организма человека и культуральной среде многих клеточных культур. Однако, определение IGF-I в этих образцах является особенно трудным из-за высокого содержания IGFBP в тестируемых образцах. Это объясняет, почему при использовании обычных тест-систем, в которых не проводится удаление IGFBP, результат определения IGF-I является некорректным, и, скорее всего, больше отражает количество IGFBP в тестируемом образце, а не концентрацию IGF-I (рисунок 1.) (15,21). При низких концентрациях IGF-I для получения необходимой чувствительности часто необходимо проведение концентрации после экстрагирования образцов. Использование ИФА тест-системы с ингибированием IGFBP позволяет избежать этих проблем и проводить простое, точное и чувствительное определение содержания IGF-I в большом количестве образцов.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения IGF-I человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы, а также спинномозговой жидкости и других биологических жидкостях и культуральной среде, в научных и диагностических целях. В связи с высокой перекрестной реактивностью IGF-I других видов млекопитающих, данную тест-систему можно использовать для определения IGF-I приматов, крупного рогатого скота, свиньи, овцы, лошади, осла, козла, собаки, кролика и морской свинки. Для определения IGF-I у крысы, мыши и курицы данная тест-система не подходит.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E20 определения IGF-I основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. IGF-I, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к IGF-I и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с IGF-I, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества IGF-I в образце.

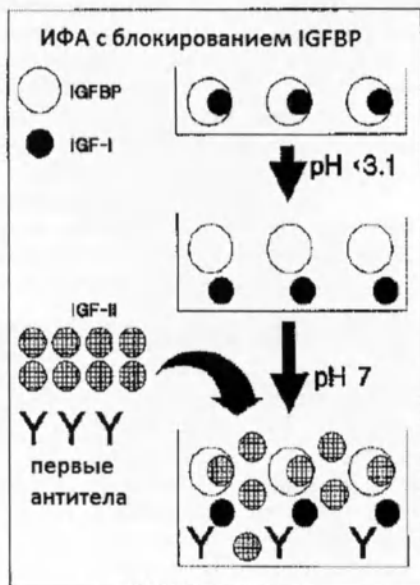


Рисунок 2. Принцип блокирования IGFBP при определении IGF-I.

Для разделения IGF-I от IGFBP образцы необходимо развести в спиртовом буфере (рисунок 2). Затем разведенные образцы вносят в лунки микропланшета, при этом pH нейтрализуется. После нейтрализации pH образцов, при избытке IGF-II, он взаимодействует с IGF-связывающими белками, что позволяет измерять свободный IGF-I. При проведении анализа IGFBP не удаляется, но его функции, а следовательно и влияние на результаты анализа нейтрализованы. За счет очень низкой перекрестной реактивности антител к IGF-I и IGF-II избыток IGF-II не влияет на взаимодействие с IGF-I. Тест проводится, как и другие обычные тесты с использованием ферментного конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена.

В качестве стандартов в наборе ELISA E20 используется рекомбинантный IGF-I с концентрациями 2; 5; 15; 30 и 50 нг/мл в соответствии с диапазоном определяемых значений. Рекомендовано проводить разведение тестируемых образцов с концентрациями IGF-I в диапазоне от 42 до 1050 нг/мл. При необходимости степень разведения можно изменять.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E20 составляет < 0,09 нг/мл (2хSD нулевого стандарта в 17 повторях).

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 6,8% и 6,7%, соответственно. Типичные примеры определений приведены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1. Воспроизводимость между сериями.

Таблица 2. Воспроизводимость внутри серии.

Линейность

Разведение	Образец 1 (пересчет, нг/мл)	Разведение	Образец 2 (пересчет, нг/мл)
1:10	137.2	1:10	439.1
1:20	133.5	1:20	500.2
1:40	133.6	1:40	499.2
1:80	134.6	1:80	490.5
1:160	134.4	1:160	494.5
1:320	135.7	1:320	526.4
		1:640	463.69
AV / SD / VC%	134.8 / 1.4 / 1.04	AV / SD / VC%	487.6 / 28.2 / 5.79

	Среднее значение	Стандартное отклонение	VC, %
Образец	(нг/мл)	(нг/мл)	
Образец 1	174	11.79	6.79
Образец 2	494	11.11	2.25
Образец 3	142	8.68	6.11

Извлечение

В различных сыворотках человека извлечение в среднем составило 98,67% от гипотетического ожидаемого значения. Тест-система Mediagnost IGF-I ELISA калибрована с использованием референсных международных стандартов NIBSC 02/254, одобренных ВОЗ (25-26).

Валидация

Mediagnost IGF-I ELISA был разработан как аналог радиоиммунного анализа Mediagnost IGF-I. Клиническая валидация радиоиммунного анализа была проведена при определении уровней IGF-I у большого количества здоровых детей и взрослых. Также обследованы здоровые низкорослые дети без дефицита гормона роста, девочки с синдромом Шершевского-Тернера, дети с синдромом Сильвера-Рассела, пациенты с дефицитом гормона роста, дети с высоким ростом, синдромом Сотоса, пациенты с акромегалией и дети с ранним половым созреванием.

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и гепаринизированной, ЭДТА или цитратной плазмы крови. Сбор образцов крови должен проводиться по стандартной методике венепункции. Охладите образцы сразу после их получения. При анализе результатов учитывайте возможное разведение образца антикоагулянтном. Если образцы не будут протестированы в день сбора их можно хранить при -20°C или ниже в плотно закрытых пробирках. Хотя проведение нескольких циклов замораживания/оттаивания не оказывало влияния на результаты определения IGF-I, избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания (при необходимости образцы аликвотируйте). Высокая чувствительность данного тест-набора позволяет определять концентрацию IGF-I в образцах малого объема. Точность анализа ограничена аккуратностью пипетирования, но не количеством IGF-I в образце.

В большинстве случаев (при тестировании сыворотки или плазмы крови, при отсутствии значительно повышенных уровней IGF-I) рекомендовано проводить разведение от 1:10 до 1:50 буфером для разведения образцов PP. В соответствии с ожидаемыми значениями концентрации IGF-I разведение может быть большим или меньшим.

Для клинических исследований сыворотки или плазмы крови рекомендовано проводить стандартное разведение 1:21. Концентрация IGF-I в других биологических жидкостях и культуральной жидкости может существенно отличаться.

Предложения по проведению разведения.

Например, в пробирку типа Эппендорф с 200 мкл буфера для разведения образцов (PP) внесите 10 мкл сыворотки или плазмы (разведение 1:21) (при проведении большой серии разведений рекомендуем использовать многоканальные пипетки). После перемешивания используйте 2х20 мкл этого разведения образцов (1:21) для анализа.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

	Реагент
1)	МТР 96-луночный микропланшет, готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к IGF-I, в пакете.
2)	CAL Стандарты А-Е, лиофилизированные, содержат рекомбинантный IGF-I человека. Концентрации стандартов в диапазоне 2-50 нг/мл (2, 5, 15, 30 и 50 нг/мл) рекомбинантного IGF-I человека. Стандарты (каждый) должны быть растворены в 500 мкл буфера PP для образцов. Растворенные стандарты могут храниться при -20°C. Перед использованием замороженных стандартов их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа. Используйте по 20 мкл на лунку в анализе.
3)	BUF PP Буфер для разведения образцов PP, 25 мл, готов к использованию, используйте для разведения стандартов и контрольных сывороток.
4)	Control Контрольные сыворотки KS1 и KS2, по 250 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 250 мкл буфера для разведения образцов PP. Растворенные контрольные сыворотки могут храниться при -20°C. Перед использованием замороженных контрольных сывороток их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа. Требуемый уровень и допустимые значения IGF-I указаны на этикетках.

		флаконов. Разведение контрольных сывороток проводите аналогично разведению тестируемых образцов.
5)	Ab	Конъюгат антител АК , 9 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные антитела к IGF-I. Используйте по 80 мкл на лунку в анализе. ВНИМАНИЕ: ГОТОВ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ!
5)	Conj	Ферментный конъюгат ЕК , 12 мл, готов к использованию, содержит конъюгат HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
6)	WASHBUF 20x	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7)	SUBST	Субстратный раствор (S) , 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
8)	H ₂ SO ₄	Стоп-раствор (SL) , 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)		Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20-25°C.
- Микропланшет и реагенты, входящие в состав набора стабильны в течение всего срока хранения при хранении в темноте при 2-8°C (см. этикетку).
- Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфер РР для разведения образцов. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.
- При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора. Растворенные стандарты и контроли могут храниться 3 месяца при -20°C. При использовании замороженных образцов быстро, но аккуратно нагрейте их (не перегревайте, без сильного встряхивания). При трехкратном размораживании/оттаивании образцов сыворотки и плазмы крови не выявлено существенных отличий определяемых уровней IGF-I.
- Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20x буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2-8°C. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры. При образовании преципитатов в буфере аккуратно растворите их при нагревании и перемешивании.
- Субстратный раствор S, стабилизированный H₂O₂ - тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и инкубируйте в темноте.
- Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микроплшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
3. Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры 20-25°C. При наличии преципитатов в буферах их перед использованием растворите их при перемешивании и согревании.
4. Не смешивайте реагенты разных серий. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
5. Микропланшет содержит «ломаемые» стрипы в рамке – держателе. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при 2-8°C в металлизированном пакете.
6. Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H₂SO₄)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

7. Вносите образцы и реагенты с максимально возможной скоростью, с постоянной последовательностью на разных этапах.

Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации.

Используйте отдельные емкости для каждого реагента. Это особенно важно для емкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из лунки обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов!

Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения промывки.

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один: **АК, ЕК, РР**.

36/37 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

38 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

39 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

40 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один: **АК, ЕК, РР, WР**.

36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

39 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

40 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

41 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

Субстрат **ТМВ (S)** содержит **3,3',5,5' тетраметилбензидин**. Храните и инкубируйте в темноте.

42/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

39 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

41 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промойте область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования. При проведении анализа рекомендовано использовать микропланшетный шейкер, если его нет в наличии, используйте альтернативную методику проведения анализа (см. ниже).

1) Внесите во все лунки по **80 мкл** конъюгата антител **АК**.

2) Внесите во все лунки по **20 мкл** буфера для разведения образцов **РР**.

3) Внесите в первые лунки (A1/A2) по **20 мкл** стандарта **A** (0 нг/мл)

Внесите в лунки B1/B2 по **20 мкл** стандарта **B** (2 нг/мл)

Внесите в лунки C1/C2 по **20 мкл** стандарта **C** (5 нг/мл)

Внесите в лунки D1/D2 по **20 мкл** стандарта **D** (15 нг/мл)

Внесите в лунки E1/E2 по **20 мкл** стандарта **E** (30 нг/мл)

Внесите в лунки F1/F2 по **20 мкл** стандарта **F** (50 нг/мл)

Для контроля точности разведения внесите в лунки G1/G2 и H1/H2 по 20 мкл **контрольных сывороток KS1 и KS2**, разведенных 1:21 в буфере для разведения образцов **РР** (или аналогично разведению тестируемых образцов).

Внесите соответствующие лунки по 20 мкл разведенных тестируемых образцов (например, разведенных 1:21 буфером для разведения образцов **РР**)

4) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **1 часа при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

5) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, используя по **250 мкл** буфера для промывок **WР** на лунку на один цикл промывки.

6) Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл** ферментного конъюгата **ЕК** в каждую лунку.

7) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **30 минут при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

8) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 5 раз **буфером для промывок WР**, как это показано в п. 5.

9) Внесите по **100 мкл** раствора субстрата **ТМВ** в каждую лунку.

10) Инкубируйте в течение **15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C)**.

11) После окончания инкубации внесите по **100 мкл** стоп-раствора **SL** в каждую лунку.

12) Измерьте оптическую плотность при **450 нм** не позднее чем через **30 минут** после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

Протокол анализа без использования шейкера

Если нет в наличии шейкера, смешивание образцов с буфером для разведения образцов РР в лунках микропланшета может быть оптимальным. В этом случае проведите разведение тестируемых образцов (1:21) буфером для разведения образцов РР вне микропланшета. Смешайте эти разведенные образцы с конъюгатом антител АК в соотношении 1:5. Внесите по 100 мкл разведенных таким образом образцов в соответствующие лунки микропланшета. Последующую инкубацию проводите при комнатной температуре (20-25°C) без встряхивания на шейкере, но время инкубации увеличьте до 2 часов (вместо 1 часа). Следующие этапы анализа осуществляйте так, как описано в протоколе анализа.

СЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,20, а значение ОП стандарта Е было выше 0,50. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации IGF-I может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при большем разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями рекомбинантного IGF-I человека.

Стандарт	A	B	C	D	E
мг/мл	2	5	15	30	50
нмоль/л	0,26	0,66	1,96	3,92	6,54

Фактор конверсии для перевода нг/мл в нмоль/л составляет 0,13074

Рассчитайте **среднее значение ОП** дублей бланка (лунки A1/A2).

Вычтите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.

Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы **полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия** (сплайн, построение от точки к точке).

Концентрация IGF-I в образцах измеряется в нг/мл и вычисляется при умножении значения полученного из калибровочной кривой на **фактор разведения**.

ЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровни у детей IGF-I очень сильно зависят от возраста, они меньше, чем у взрослых в возрасте до 60 лет. В таблице 5 приведены референсные значения IGF-I в различных возрастных группах, распределенные по перцентилям. У мальчиков и девочек (юношей и девушек) в возрасте от 8 до 19 лет, референсные значения приведены отдельно, так как у девочек пик пубертатного развития происходит на 1 год ранее, чем у мальчиков. Графически референсные значения представлены на рисунках 3, 4 и 5. Основная проблема при интерпретации результатов определения IGF-I состоит в том, что низкий рост чаще связан с задержкой развития, нежели с метаболическими или эндокринными нарушениями (конституциональная задержка роста и созревания).

Резкое повышение концентрации IGF-I во время полового созревания может вызвать некоторую неуверенность в адекватности соотношения измеренных уровней с биологическим возрастом. Для полноценной интерпретации полученных результатов рекомендовано учитывать и стадию полового развития (таблица 4, рисунок 6).

Ограничения анализа

Уровни IGF-I зависят в большой степени от уровня синтеза гормона роста. Снижение уровней IGF-I, однако, не указывает на дефицит гормона роста, так как на концентрацию IGF-I в плазме крови могут влиять много других факторов, которые также необходимо учитывать для правильной интерпретации полученных результатов. Снижение уровней IGF-I обнаружено при голодании (более суток), недоедании, мальабсорбции, кахексии, снижении функции печени, а также при гипотиреозе и нелеченном сахарном диабете. Уровни могут быть низкими при хронических воспалительных заболеваниях и злокачественных новообразованиях. Уровни IGF-I повышаются при преждевременном половом созревании. При таких клинических состояниях, как гиперпролактинемия, а также у пациентов с глантиофарингитом, уровни IGF-I могут быть в пределах нормальных величин, несмотря на дефицит гормона роста. На последних сроках беременности уровни IGF-I у женщин немного повышаются.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 4. Референсные значения уровней IGF-I в сыворотке крови (нг/мл) в зависимости от стадии полового созревания по Tanner. Так как не обнаружено достоверных отличий уровней у мальчиков и девочек, данные по двум полам объединены. Включены только результаты обследования детей и подростков от 7 до 17 лет.

Половое развитие	Перцентиль			
	0,1.	5.	50.	95.
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Возраст, лет	Перцентиль													
	0,1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-2	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9 (мальчики)	54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362

(девочки)	55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10 (мальчики)	63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
(девочки)	68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11 (мальчики)	77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
(девочки)	81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12 (мальчики)	85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
(девочки)	91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13 (мальчики)	88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
(девочки)	116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14 (мальчики)	111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
(девочки)	163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15 (мальчики)	140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
(девочки)	193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16 (мальчики)	176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
(девочки)	187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17 (мальчики)	178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
(девочки)	183	225	270	298	336	366	394	422	452	486	530	597	660	792
17-18 (мальчики)	173	207	243	265	294	317	337	358	380	405	436	484	527	618
(девочки)	176	210	246	268	297	320	341	362	384	409	441	488	533	624
18-19 (мальчики)	167	201	235	256	285	307	327	347	368	393	423	469	512	600
(девочки)	167	199	233	254	281	302	322	341	362	385	414	458	499	583
19-20	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Таблица 5.: Уровень IGF-I в сыворотке крови здоровых лиц различного возраста. Включены только результаты обследования лиц в возрасте от 7 до 17 лет. Так как пик концентрации IGF-I в пубертатном периоде у девочек обнаруживается примерно на 2 года раньше, чем у мальчиков, данные ранжированы в соответствии и с гендерной принадлежностью.

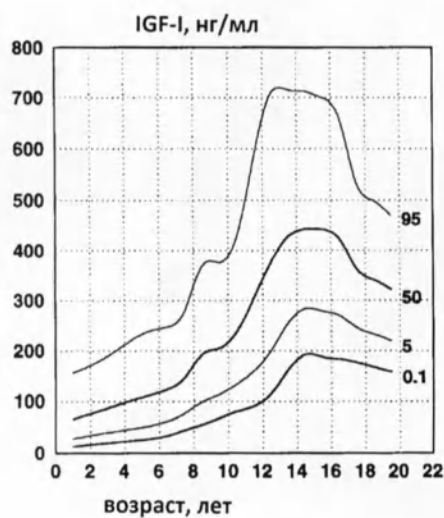


Рисунок 3. Референсные значения IGF-I в сыворотке крови у девочек (девушек) в зависимости от возраста.

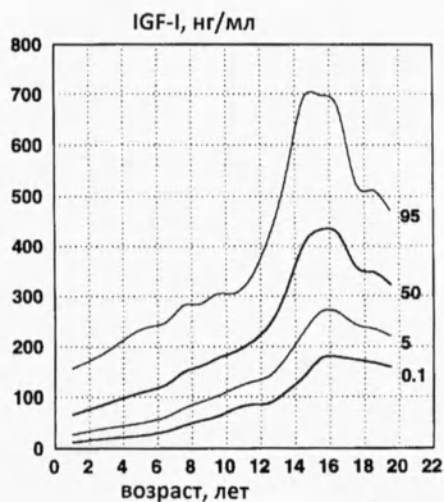
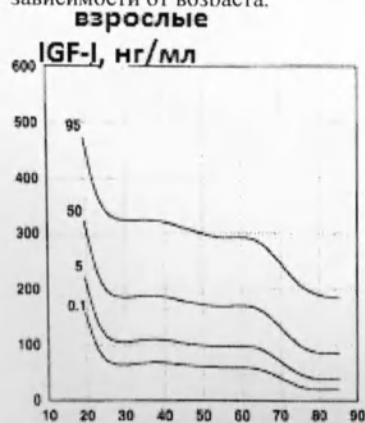


Рисунок 4. Референсные значения IGF-I в сыворотке крови у мальчиков (юношей) в зависимости от возраста.

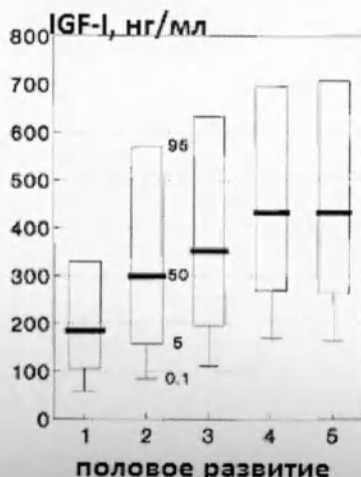


Рисунок 5. Референсные значения IGF-I у взрослых в сыворотке крови в зависимости от возраста.

Рисунок 6. Средние уровни IGF-I у здоровых детей и подростков в зависимости от полового развития (включены обследуемые от 7 до 17 лет обоих полов).

Вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»
 факс (495) 647-2740 (многоканальный),
 E-mail: info@biochemmack.ru

ПОДПИСАНО»

кафедрой клинической лабораторной
 диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, д.м.н., профессор



Всего прошито
и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор
ЗАО "БиоХимМак"



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

2

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2012г.



**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения инсулиноподобного фактора роста II
Human Insulin-like Growth Factor-II
(IGFBP-blocked)**

Производитель: «Медиагност ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Количественное определение IGF-II без предварительной экстракции образцов
 - Калибровка по Международному Стандарту ВОЗ NIBSC 96/538
- интерференции IGF-связывающих белков при избытке IGF-I
ое измерение очень низкой концентрации IGF-II: высокая чувствительность **0.02 нг/мл**
роизводительность внутри серии 6.6% и воспроизводительность между сериями 7.2%
сть применения – клиническая лабораторная диагностика.

ПРИМЕНЕНИЕ

Инсулиноподобные факторы роста (IGF)-I и -II играют основную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки различных типов тканей (1-3). М.м. IGF-I, также называемого соматомедин С(4), Да (5). Его экспрессия в основном регулируется гормоном роста и питанием (6). Известно, что многие гормоны и пептидные факторы влияют на синтез IGF-II в различных тканях. Биодоступность IGFs регулируется специфическими связывающими белками (IGFBP). Кроме высоко аффинных инсулиноподобный фактор роста связывающих белков 1-6, IGFs также связываются с IGFBP-родственными белками (7, 8, 22). Эти связывающие белки связывают IGF-I и IGF-II с одинаковой аффинностью, или предпочтительно IGF-II (9, 10). Прямое измерение IGFs в образцах сыворотки без предварительной обработки дает ложные значения из-за очень медленной диссоциации комплекса IGF/IGFBP, во время инкубаций при тестировании только часть IGF-II, присутствующего в образце, может связаться с антителами и быть выявлена.

Таким образом, применялись различные методы для физического разделения IGF-II и белков, его связывающих, перед началом тестирования, включая (а) гель-фильтрацию в кислых условиях, (b) твердофазную экстракцию и (с) экстракцию с использованием этанола и кислоты (2, 12, 13). Эти методы, однако, либо неудобные, либо требуют много времени, либо обладают низкой воспроизводимостью.

Данный метод простой, быстрый, его результаты не зависят от концентрации связывающих белков в образце. Он основан на высокой специфичности используемых антител к IGF-II. Фактически отсутствует перекрестная реактивность с IGF-I. Это позволяет отделить IGF-II от связывающих белков подкислением и блокированием свободных связывающих белков добавлением IGF-I. Таким образом, эндогенный IGF-II остается в растворе в свободном виде.

НАЗНАЧЕНИЕ

Научные исследования в области гипертрофии новорожденных (IGF-II является фетальным фактором роста) и злокачественных образований (IGF-II является моногенным фактором роста). Возраст-зависимые референсные значения приведены в таблице 4.

IGF-II может быть использован в дифференциальной диагностике злокачественных заболеваний. Так, с помощью IGF-II можно выполнять дифференциальную диагностику карциномы и аденомы коры

надпочечников (24). Стадирование и дифференциация между гиперплазией и карциномой могут быть значительно улучшены при использовании измерения IGF-II при раке предстательной железы (25). Система IGF, видимо, также имеет отношение к нейродегенеративным заболеваниям, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (26).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод Mediagnost ELISA предназначен для количественного определения IGF-II и основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе. В методе используются два типа специфических высокоаффинных антител к этому белку. Первые антитела, иммобилизованные в лунках микропланшета, и добавляемые вторые биотинилированные антитела связываются с IGF-II, присутствующем в образце. Затем ферментный конъюгат стрептавидин-пероксидаза связывается с образовавшимся комплексом. В субстратной реакции изменение окрашивания будет катализироваться высоко специфично и количественно зависеть от уровня IGF-II в образцах.

Комплекс IGF-II-IGFBP диссоциирует при добавлении кислого буфера. IGFBPs блокируется избытком IGF-I, таким образом позволяя выполнить измерение свободного IGF-II. При тестировании данным методом IGFBPs не удаляют, но их функция и, следовательно, их влияние нейтрализуются.

Благодаря низкой перекрестной реактивности антител к IGF-II с IGF-I, избыток IGF-I не нарушает взаимодействие первых антител с IGF-II.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Mediagnost ELISA определения IGFBP-3 кат. № E03A основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высокоаффинных антител к этому белку. IGFBP3, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические анти-IGFBP-3 антитела и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с IGFBP-3, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества IGFBP-3 в образце. В качестве стандартов в наборе ELISA E03A используется человеческий **IGFBP-3** с концентрациями **0.4; 2; 6; 15 и 30 нг/мл**.

Данный метод IGF-II ELISA E30 прокалиброван по Международному Стандарту ВОЗ NIBSC 96/538 Стандартами набора ELISA E30 является человеческий **IGF-II** с концентрациями **0.45; 1.5; 3; 5.63 и 9 нг/мл**, соответственно, диапазон определяемых значений, при использовании рекомендованного разведения образцов, до **2400 нг/мл**. За счет изменения разведения образцов метод может быть адаптирован для тестирования индивидуальных образцов.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E30 составляет **0.02 нг/мл** (2 SD при тестировании 20 повторов нулевого стандарта).

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 7.2 % и 6.6 %. Типичные примеры определений приведены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1: воспроизводимость между сериями (n=12).

	Среднее значение (нг/мл)	стандартное отклонение (нг/мл)	VC, %
Образец 1	381.53	27.54	7.22
Образец 2	817.81	57.70	7.06
Образец 3	639.41	45.47	7.11

Таблица 2: воспроизводимость внутри серии (n=16).

	Среднее значение (нг/мл)	стандартное отклонение (нг/мл)	VC, %
Образец 1	666.38	20.45	3.07

образец	875.22	57.89	6.61
---------	--------	-------	------

благодаря высокой специфичности используемых антител, эндогенный и структурно очень схожий IGF-присутствующий в образце в различных концентрациях, не влияет на правильность определения IGF-II концентрациях до 1000 нг/мл (Таблица 3).

Таблица 3: Зависимость определяемого количества IGF-II от содержания IGF-I в образце.

Добавленный IGF-I (нг/мл)	Образец сыворотки (нг/мл)	NIBSC 96/538 в буфере для образца (нг/мл)
0	603	3,49
100	630	3,39
250	605	3,44
500	614	3,59
1000	604	3,68

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки, гепариновой, ЭДТА и цитратной плазмы. Разведение образца антикоагулянтом необходимо учитывать.

Кроме того, могут быть использованы следующие типы образцов: моча, слюна (низкие концентрации, разведение не менее 1:10), спинно-мозговая жидкость (разведение не менее 1:10) и культуральная среда (включая 5% FCS, разведение не менее 1:5). Концентрация IGF-II в других биологических жидкостях или супернатантах клеточных культур могут сильно отличаться от значений в сыворотке.

Образцы необходимо приготовить, как обычно рекомендуется: как можно быстрее и охладить как можно быстрее. Для длительного периода хранения неразведенные образцы необходимо заморозить при -20°C или ниже в тщательно закрытых пластиковых пробирках.

Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания сыворотки/плазмы (если необходимо, аликвотируйте образец перед замораживанием), хотя показано, что на уровень IGFBP-3 не влияют повторные циклы замораживания/оттаивания.

Данный метод IGF-II ELISA E30 позволяет выполнить правильные определения в образцах, разведенных не менее чем в соотношении 1:401, и более, во всем диапазоне измеряемых значений.

Высокая чувствительность метода позволяет определять IGF-II в малых объемах образца, при этом объем ограничен возможностью точного пипетирования, а не количеством IGF-II.

В большинстве случаев подходящим является разведение образцов сыворотки или плазмы в соотношении 1:401. Однако, соответствующее подходящее разведение должно быть подобрано перед тестированием.

Рекомендуемый протокол разведения:

Внесите **2000 мкл буфера РР для образца** в пробирки РЕ/РР (для тестирования больших серий рекомендуется использовать мультистеппер); затем внесите по **5 мкл образца сыворотки или плазмы** (разведение 1:401). После тщательного перемешивания используйте **50 мкл** полученного разведения для одного определения.

Так как точность пипетирования может быть повышена при пипетировании 10 мкл образца, альтернативно можно использовать двукратное разведение, для этого внесите **1000 мкл буфера РР для образца** в пробирки РЕ/РР, затем внесите по **10 мкл образца сыворотки или плазмы** (разведение 1:101) (samples are 1:101 diluted), после тщательного перемешивания разведите 50 мкл полученного разведения в 150 мкл буфера для образцов (разведение 1:404). После тщательного перемешивания используйте **50 мкл** полученного разведения для одного определения.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

		Реагент
1)	MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к IGF-II человека, в пакете.
		Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат человеческий IGF-II.

2)	CA L	Концентрации стандартов в диапазоне 0.45 – 9 нг/мл (0,45; 1,5; 3; 5,63; 9 нг/мл) IGF-II, стандарты должны быть растворены в 500 мкл буфера РР для образцов. После использования храните растворенные стандарты в оригинальных флаконах при –20°C. При повторном использовании стандартов, оттаивайте их как можно быстрее, но аккуратно (не используйте температуру выше комнатной, не перемешивайте интенсивно на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты тестирования. Используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
4)	BU F PP	Буфер РР для образцов , 125 мл, готов к использованию, используйте для растворения стандартов (А-Е) и контролей , и для разведения образцов и контролей
5)	Contr ol	Контрольные сыворотки KS1 и KS2, 250 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 250 мкл буфера РР для образцов. После использования храните растворенные стандарты в оригинальных флаконах при –20°C. При повторном использовании контролей, оттаивайте их как можно быстрее, но аккуратно (не используйте температуру выше комнатной, не перемешивайте интенсивно на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты тестирования. Допустимые значения IGF-II указаны на этикетках флаконов. Выполняйте разведения в соответствии с разведением исследуемых образцов.
6)	Ab CONJ	Конъюгат антител АК, 6 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные анти-IGF-II антитела. Используйте по 500 мкл на лунку в анализе.
7)	CONJ	Ферментный конъюгат ЕК, 12 мл, готов к использованию, содержит конъюгат HRP (пероксидаза хрена)-стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
8)	WASH BUF 20x	Буфер для промывок (WP), 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
9)	SUBS T	Субстратный раствор (S), 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
10)	H ₂ SO 4	Стоп-раствор (SL), 12 мл, готов к использованию, 0.2 М серная кислота. Внимание: кислота!
11)		Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2 х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки (50 и 100 мкл), одноканальные и многоканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками к ним.
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство

микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Перемешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшет и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2 – 8°C.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20 - 25°C). Если в пробирках образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20-25°C

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфера РР для образцов. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вихре.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 3 месяца при -20°C. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Перед использованием замороженных стандартов их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вихре), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20х буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2-8°C.

РАСТВОР СУБСТРАТА

Раствор субстрата S, стабилизированный H₂O₂-тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и инкубируйте в темноте.

МИКРОПЛАНШЕТ

Храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при 2-8°C, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на наборе.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
3. Температура влияет на абсорбцию реагентов. Однако это не влияет на значения, получаемые для образцов пациентов.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
5. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации. Используйте отдельные ёмкости для каждого реагента. Это особенно важно для ёмкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов! Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения этапа промывки.
6. Внимание: данный набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения.

Человеческая сыворотка

Содержится в следующих компонентах: контрольные сыворотки KS1 и KS2.

Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми

компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Стоп-раствор содержит 0.2 М серную кислоту (H₂SO₄)

36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

36 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

38.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

2-метил-4-изотиазолин-3-один

содержится в следующих компонентах: АК, ЕК, VP, PP

0.01% раствор 2-метил-4-изотиазолин-3-один

36 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

38 Возможна сенсibilизация при контакте с кожей

36 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

38 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу.

5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

содержится в следующих компонентах: АК, ЕК, VP, WP, PP

0.01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

38 Возможна сенсibilизация при контакте с кожей

36 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

38.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды.

Субстрат ТМВ (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин.

20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

36 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

38.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду и обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей и оборудования соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ: все определения (стандарты, контроли и образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, **ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL** необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

Рекомендуется использовать микропланшетный шейкер.

Внесите по все лунки, предназначенные для текущей постановки, по **50 мкл конъюгата антител АК**.

Внесите по **50 мкл буфера РР** для образцов в лунки A1/2.

Внесите по **50 мкл стандарта А (0.45 нг/мл)**, в лунки B1/2,

Внесите по **50 мкл стандарта В (1.5 нг/мл)**, в лунки C1/2

Внесите по **50 мкл стандарта С (3 нг/мл)**, в лунки D1/2,

Внесите по **50 мкл стандарта D (5.63 нг/мл)**, в лунки E1/2,

Внесите по **50 мкл стандарта Е (9 нг/мл)**, в лунки F1/2.

Для контроля правильности постановки внесите по **50 мкл** разведения 1:401 (или другого разведения, соответствующего разведению образцов) в буфере **РР** для образцов **контрольных сывороток KS1 и KS2** в лунки G1/2 и H1/H2.

Внесите по **50 мкл каждого разведенного образца** (обычно рекомендуемое разведение 1:401 в буфере **РР** для образцов) в оставшиеся лунки, в соответствии с протоколом анализа.

Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 2 часов при комнатной температуре (шейкируйте при ≥ 350 rpm).

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, используя по **250 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки.

Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл ферментного конъюгата ЕК** в каждую лунку.

Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (если возможно, шейкируйте при ≥ 350 rpm).

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, как это указано в шаге 5.

Внесите по **100 мкл раствора субстрата S** в каждую лунку.

1) Инкубируйте в течение **30 минут в темноте при комнатной температуре**.

1) После окончания инкубации внесите по **100 мкл стоп-раствора SL** в каждую лунку.

2) Измерьте оптическую плотность при **450 нм** не позднее чем через **30 минут после внесения стоп-раствора** (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0.20, а значение ОП стандарта Е было выше 1.00.

Образцы, для которых получены значения ОП выше значения ОП стандарта Е, не попадают в диапазон измеряемых значений. Для получения достоверных значений такие образцы необходимо развести дополнительно и протестировать еще раз.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями hIGF-II:

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	0.45	1.5	3	5.63	9

1) Рассчитайте среднее значение ОП (МА) дублей бланка (лунки A1/A2).

2) Вычтите полученное среднее значение (МА) бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех других образцов, стандартов и контролей.

3) Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

4) Рекомендации: расчет калибровочной кривой необходимо выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычно калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы полиномы более высокой степени или четырёхпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия (сплайн, построение от точки к точке).

5) Концентрация hIGF-II в образцах, в нг/мл, может быть определена как произведение значения, полученного из калибровочной кривой, на соответствующий коэффициент разведения.

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Таблица 4: Уровень IGF-II в сыворотке, в нг/мл, у здоровых людей различного возраста *

Процентиль

возрастная группа	5th	50th	95th
новорожденные	158	284	516
1 неделя	350	486	673
1 месяцев	348	551	871
2 месяцев	388	582	876
1 года	384	596	926
1 лет	397	617	920
2 лет	419	638	973
3 лет	433	656	997
4 лет	442	662	994
5 лет	448	671	1006
6 лет	455	679	1014
7 лет	452	686	1042
10 лет	436	679	1058
15 лет	442	680	1049
20 лет	407	650	1039
30 лет	396	644	1049
40 лет	373	611	1000

Измерения были выполнены после экстракции с использованием этанола и кислоты, и полученные значения были скорректированы по воспроизводимости (фактор коррекции 1.2).

По вопросам качества продукции обращаться по адресу:

19991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный),

E-mail: info@biochemmack.ru

СОГЛАСОВАНО»

ав. кафедрой клинической лабораторной

диагностики ГБОУ ДПО РМАНО Минздрава России, д.м.н., профессор



1	2016	2017	2018
2	312	324	321
3	373	385	350
4	371	377	346
5	316	382	388
6	303	308	384
7	304	314	307
8	300	323	319
9	301	309	323
10	302	307	345
11	303	308	346
12	304	309	347
13	305	310	348
14	306	311	349
15	307	312	350
16	308	313	351
17	309	314	352
18	310	315	353
19	311	316	354
20	312	317	355
21	313	318	356
22	314	319	357
23	315	320	358
24	316	321	359
25	317	322	360
26	318	323	361
27	319	324	362
28	320	325	363
29	321	326	364
30	322	327	365
31	323	328	366
32	324	329	367
33	325	330	368
34	326	331	369
35	327	332	370
36	328	333	371
37	329	334	372
38	330	335	373
39	331	336	374
40	332	337	375
41	333	338	376
42	334	339	377
43	335	340	378
44	336	341	379
45	337	342	380
46	338	343	381
47	339	344	382
48	340	345	383
49	341	346	384
50	342	347	385
51	343	348	386
52	344	349	387
53	345	350	388
54	346	351	389
55	347	352	390
56	348	353	391
57	349	354	392
58	350	355	393
59	351	356	394
60	352	357	395
61	353	358	396
62	354	359	397
63	355	360	398
64	356	361	399
65	357	362	400
66	358	363	401
67	359	364	402
68	360	365	403
69	361	366	404
70	362	367	405
71	363	368	406
72	364	369	407
73	365	370	408
74	366	371	409
75	367	372	410
76	368	373	411
77	369	374	412
78	370	375	413
79	371	376	414
80	372	377	415
81	373	378	416
82	374	379	417
83	375	380	418
84	376	381	419
85	377	382	420
86	378	383	421
87	379	384	422
88	380	385	423
89	381	386	424
90	382	387	425
91	383	388	426
92	384	389	427
93	385	390	428
94	386	391	429
95	387	392	430
96	388	393	431
97	389	394	432
98	390	395	433
99	391	396	434
100	392	397	435

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2012г.

Иммуноферментный набор реагентов для количественного определения белка-1, связывающего инсулиноподобные факторы роста IGFBP-1.
Производитель: «Медиагност ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Количественное определение IGFBP-1 в сыворотке и других биологических жидкостях, таких как амниотическая жидкость, моча, слюна, культуральная среда и т.д.
- Воспроизводимость внутри серии 7.4% и воспроизводимость между сериями 6.8%
- Очень высокая аналитическая чувствительность 0.02 нг/мл
- Результаты доступны через **1.75 часа инкубационного времени.**
- Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ОПИСАНИЕ

Инсулиноподобные факторы роста I и – II присутствуют в свободном виде в биологических жидкостях, но связываются со специфическими связывающими белками. К настоящему времени известны различные связывающих белков (IGFBP-1 –7) и дополнительно выявлены несколько IGFBP-твенных белков.

Доступность IGF регулируется этими IGFBPs, или их протеолитическим расщелением, которое снижает их аффинность к IGF. Но IGFBPs, также, как и их фрагменты, получающиеся в результате протеолитического расщепления, могут также проявлять IGF-независимые эффекты, такие как влияние на миграцию или пролиферацию клеток.

IGFBP-1 (плацентарный белок 12) состоит из 234 аминокислот, его м.м. составляет приблизительно 25 кДа. Кодированный регион ДНК локализован на хромосоме 7 [1, 2]. IGFBP-1 в основном синтезируется у плода и в печени взрослых и децидуальной оболочкой. Интенсивность экспрессии варьирует во время менструального цикла и максимальная экспрессия наблюдается в поздней секреторной фазе [3, 4]. Кроме того, экспрессия IGFBP-1 видимо регулируется концентрацией инсулина, при этом инсулин ингибирует экспрессию. Регуляция инсулином приводит к ежедневным флуктуациям до в 10 раз [5].

IGFBP-1 проходит посттрансляционную модификацию, фосфорилирование остатков серина в положениях 101, 119 и 169. Фосфорилирование имеет физиологическую значимость, оно повышает аффинность IGFBP-1 к IGF. У взрослых людей основной формой в кровотоке является фосфорилированный IGFBP-1 печени. IGFBP-1, продуцируемый тканью эндометрия, значительно менее фосфорилирован, чем печеночная форма [6].

При беременности концентрация IGFBP-1 в материнской сыворотке значительно повышается, достигая максимальных значений во втором триместре, или к 22-23 неделе гестации (75.8 нг/мл) [5] и медленно снижается вплоть до родов. Концентрация IGFBP-1 повышается не только в материнской крови, но и в сыворотке плода, и достигает очень высоких концентраций в амниотической жидкости. В ней концентрация может повышаться в более чем в 1000 раз по сравнению с уровнем в сыворотке [7]. Долговременные изменения концентрации IGFBP-1 в сыворотке также могут выявляться в амниотической жидкости: уровень IGFBP-1 у ребенка снижается после рождения до тех пор, пока не достигает низкого относительно устойчивого уровня в пубертате и у взрослых [8, 9].

На краткосрочную концентрацию IGFBP-1 в сыворотке сильно влияет качество питания и инсулин. Снижение уровня IGFBP-1 может наблюдаться во время поста или при диабете; уровень IGFBP-1 повышается при интенсивных физических нагрузках [10-12]. Была исследована значимость определения уровня IGFBP-1 в сыворотке или амниотической жидкости в диагностике различных патологий. Была

ценена диагностическая значимость для трисомии 18, задержке внутриутробного развития, опухолях эндометрия и пре-эклампсии [14].

Очень тщательно была исследована диагностическая значимость при инсулинорезистентности и преждевременном разрыве оболочки, и особенно во высокая диагностическая значимость была продемонстрирована во втором случае.

Энергетический метаболизм

На основании того, что инсулин влияет на концентрацию IGFBP-1 в сыворотке, утверждается, что IGFBP-1 является возможным маркером инсулинорезистентности. Так как измерение IGFBP-1 значительно проще, чем скорость поглощения глюкозы, это могло бы упростить диагностику инсулинорезистентности.

В небольшом исследовании Maddux et al. смогли показать, на 23 пациентах без диабета, что концентрация IGFBP-1 в сыворотке очень хорошо коррелирует со скоростью поглощения глюкозы, даже лучше, чем индекс HOMA (оценка гомеостатической модели) [13].

Беременность

У беременных была показана значительная разница в уровне IGFBP-1 в сыворотке у здоровых беременных, беременных с диабетом и при пре-эклампсии (102,8 vs. 203,71 или 281,09 нг/мл, соответственно) [15].

Кроме того, использование IGFBP-1 в качестве маркера преждевременного разрыва околоплодной оболочки показало высокие значения специфичности (97%) и чувствительности (75%) определения IGFBP-1 в вагинальном/цервикальном секретах. В случае интактной оболочки концентрация IGFBP-1 в секрете < 90 нг/мл. В течение 8 часов после спонтанного или индуцированного разрыва оболочки значение IGFBP-1 значительно повышается, медиана концентрации составляет 1900 нг/мл. В этом исследовании концентрация IGFBP-1 >100 нг/мл была установлена как дискриминационный уровень для выявления в амниотической жидкости и диагностики разрыва оболочки [16]. Положительная прогностическая значимость составила 97%, это ясно показывает что IGFBP-1 является хорошим маркером для выявления преждевременного разрыва околоплодной оболочки [17].

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения IGFBP-1 в образцах человеческой сыворотки, гепариновой или ЭДТА плазмы, и других биологических жидкостях, таких как амниотическая жидкость, моча, слюна, в диагностических и научных целях.

Он также может быть использован для определения IGFBP-1 в культуральной среде.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA определения IGFBP-1 кат. № E01 основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. IGFBP-1, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические анти-IGFBP-1 антитела и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с IGFBP-1, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества IGFBP-1 в образце. В качестве стандартов в наборе ELISA E03A используется нативный человеческий IGFBP-1 с концентрациями 0; 0.1; 0.5; 1;

2; 4 и 8 нг/мл.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E01 составляет 0.02 нг/мл (эквивалентно 2 пг на лунку; 2 SD при тестировании 22 повторов нулевого стандарта).

Определение IGFBP-1 данным методом Mediagnost ELISA E01 достоверно в очень широком диапазоне возможных разведений. Линейность разведения сыворотки очень хорошая в широком диапазоне (таблица 1).

Таблица 1: Линейность разведений, типичные результаты для двух образцов сыворотки.

Разведение:	Образец 1 (пересчитанные)	Разведение:	Образец 2 (пересчитанные)
-------------	------------------------------	-------------	------------------------------

	значения, нг/мл)		значения, нг/мл)
1:5	14.38	1:2.5	16.81
	14.22	1:5	15.51
1:10	13.42	1:10	16.22
1:20	13.81	1:20	14.45
1:40	13.11	1:40	15.12
1:80	12.52	1:80	13.43
1:160	14.65	1:160	15.95
AV/1SD/CV%	13.73/0.76/5.53	AV/1SD/CV%	15.36 / 1.14 / 7.44

V = среднее значение, SD = стандартное отклонение; VC = коэффициент вариации.

Извлечение нативного IGFBP-1 в образцах различных матриц указано в таблице 4.

Измерение перекрестной реактивности с рекомбинантным IGFBP-2 и IGFBP-3 показало ее пренебрежительно низкий уровень, при измерении 500 нг/мл каждого, уровень составил менее 0.0015%.

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 7.4 % и 6.8 %. Типичные примеры определений приведены в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2: воспроизводимость между сериями.

	Среднее значение	стандартное отклонение	VC
Образец 1	2.31	0.12	5.23
Образец 2	18.41	1.36	7.36
Образец 3	32.79	2.22	6.75

Таблица 3: воспроизводимость внутри серии.

	Среднее значение	стандартное отклонение	VC
Образец 1	1.45	0.08	5.87
Образец 2	20.64	1.29	6.23
Образец 3	162.99	11.09	6.81

Сравнение определений IGFBP-1 в 35 образцах сывороток здоровых взрослых людей, выполненных данным методом Mediagnost ELISA E01 и другим коммерчески доступным ИФА методом показал очень хорошую согласованность абсолютных концентраций с очень хорошей корреляцией: $y = 1.15x + 0.12$; $r^2 = 0.94$, сравнение с другим коммерческим методом ИФА также показала очень хорошую корреляцию: $y = 3.33x + 3.0$; $r^2 = 0.90$, измеренные значения составили приблизительно одну треть от соответствующих концентраций.

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки, гепариновой и ЭДТА плазмы. Специальная предварительная пробоподготовка не требуется. Результаты при тестировании цитратной плазмы снижены примерно на 15%. Незначительный гемолиз в образцах не влияет на тестирование данным методом.

Образцы необходимо приготовить согласно обычным рекомендациям: как можно быстрее отделить от клеточных элементов и охладить. Если между сбором образца и тестированием требуется хранить

образец длительное время, храните неразведенные образцы замороженными при -20°C или ниже, в плотно закрытых пробирках.

В принципе, необходимо избегать повторных циклов замораживания/оттаивания сыворотки/плазмы (если необходимо, аликвотируйте образец перед замораживанием), хотя показано, что на уровень IGFBP-1 не влияют повторные (до 3) циклы замораживания/оттаивания.

В большинстве случаев (например, при тестировании образцов сыворотки или плазмы, когда не ожидаются экстремальные значения, см. таблицу 4 для дополнительной информации) может быть выполнено разведение **1:16 буфером VP для разведения образцов**, при этом соответствующий диапазон определяемых значений составит 0 - 128 нг/мл.

При необходимости, в зависимости от ожидаемых концентраций IGFBP-1, разведение буфером VP может быть выше или ниже (не менее чем 1:2.5). Концентрации IGFBP-1 могут совершенно различаться в различных биологических жидкостях человеческого происхождения, отличающихся от сыворотки или супернатантах клеточных культур. Примеры, а также рекомендации по разведению приведены в таблице 4.

Образцы	концентрация IGFBP-1 (нг/мл)	Извлечение добавленного IGFBP-1	Рекомендованное разведение образцов для тестирования методом E01
Амниотическая жидкость	8,140.0 16,450.0	n.d.	Индивидуально, от не менее 1:5000 до 1:25000
Материнское молоко	5.12 20.2	91% (разведение 1:10) n.d.	1:10
Моча	0.07	89.8% (разведение 1:2.5)	1:2.5
Слюна	< 0.02 нг/мл	62.5% (разведение 1:2.5)	Не менее 1:2.5
Бронхиальный лаваж	< 0.02 нг/мл	100% (разведение 1:2.5)	1:2.5
Мокрота	< 0.02 нг/мл	100% (разведение 1:20)	1:20
Пул сывороток	0.57	105.1% (разведение 1:16)	1:16 (общая рекомендация)
Сыворотки беременных	n.d.	n.d.	1:25
Культуральная среда	Индивидуально	94.5% (разведение 1:5)	Индивидуально, от не менее 1:5

n.d. – не определялось.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

	Реагент
1) MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к IGFBP-1 человека, в пакете.

2)	CA L	Стандарты А-Г , лиофилизированные, содержат человеческий IGFBP-1. Концентрации стандартов в диапазоне 0 – 8 нг/мл (0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4 и 8 нг/мл) IGFBP-1, стандарты должны быть растворены в 500 мкл буфера VP для образцов. Используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
3)	BUF VP	Буфер для разведения VP, 125 мл, готов к использованию, используйте для разведения образцов, стандартов и контролей.
4)	Contr ol	Контрольные сыворотки KS1 и KS2, по 250 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 250 мкл буфера VP для образцов. Допустимые значения IGFBP-1 указаны на этикетках флаконов. Выполняйте разведения в соответствии с разведением исследуемых образцов. Используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
5)	Ab	Конъюгат антител АК, 6 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные анти-IGFBP-1 антитела. Готов к использованию. Используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
6)	CONJ	Ферментный конъюгат ЕК, 12 мл, готов к использованию, содержит конъюгат HRP (пероксидаза хрена)-стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
7)	WASH BUF 20x	Буфер для промывок (WP), 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
8)	SUBS T	Субстратный раствор (S), 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ). Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
9)	H ₂ SO 4	Стоп-раствор (SL), 12 мл, готов к использованию, 0.2 М серная кислота. Внимание: кислота! Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
10)		Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2 х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Не смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшет и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2 – 8°C.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20 - 25°C). Если в пробирках образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20-25°C

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - G и контроли KS1 & KS2) используйте буфер VP для разведения. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 3 месяца при -20°C. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Перед использованием замороженных стандартов их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа.

Если планируется выполнить несколько независимых постановок одного набора в течение длительного промежутка времени, аликвотируйте компоненты перед замораживанием на подходящие малые объемы.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20х буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2-8°C.

РАСТВОР СУБСТРАТА

Раствор субстрата S, стабилизированный H₂O₂-тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и инкубируйте в темноте.

МИКРОПЛАНШЕТ

Храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при 2-8°C, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на наборе.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
3. Температура влияет на абсорбцию реагентов. Однако это не влияет на значения, получаемые для образцов пациентов.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
5. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации. Используйте отдельные ёмкости для каждого реагента. Это особенно важно для ёмкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов! Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения этапа промывки.
6. Внимание: данный набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения.

Человеческая сыворотка

Содержится в следующих компонентах: контрольные сыворотки KS1 и KS2.

Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Стоп-раствор содержит 0.2 М серную кислоту (H₂SO₄)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

2-метил-4-изотиазолин-3-один

содержится в следующих компонентах: АК, VP, PP

01% раствор 2-метил-4-изотиазолин-3-один

4 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

3 Возможна сенсibilизация при контакте с кожей

6 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

3 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу.

5-хлор-2-метил-2Н-изотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

содержится в следующих компонентах: АК, VP, WP, PP

01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил-2Н-изотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

6/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

3 Возможна сенсibilизация при контакте с кожей

6 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

38.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды.

субстрат TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин.

20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду и обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки загрязненных поверхностей и оборудования соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли и образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, **ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL** необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

Внимание: лунки A1/A2 должны оставаться пустыми до внесения раствора субстрата, шаг 8.

1) Внесите по все лунки, предназначенные для текущей постановки, кроме лунок A1/A2, по **50 мкл конъюгата антител АК**.

Внесите по **50 мкл стандарта А (0 нг/мл)**, в лунки B1/2,
 внесите по **50 мкл стандарта В (0.1 нг/мл)**, в лунки C1/2
 внесите по **50 мкл стандарта С (0.5 нг/мл)**, в лунки D1/2,
 внесите по **50 мкл стандарта D (1 нг/мл)**, в лунки E1/2,
 внесите по **50 мкл стандарта Е (2 нг/мл)**, в лунки F1/2.
 внесите по **50 мкл стандарта F (4 нг/мл)**, в лунки G1/2/
 внесите по **50 мкл стандарта G (8 нг/мл)**, в лунки H1/2

Для контроля правильности постановки внесите по **50 мкл** разведения 1:16 (или другого разведения, соответствующего разведению образцов) в буфере **VP** для разведения **контрольных сывороток KS1 и KS2** в лунки A3/4 и B3/4.

Внесите по **50 мкл каждого разведенного образца** (обычно рекомендуемое разведение 1:16 в буфере **VP** для образцов) в оставшиеся лунки, в соответствии с протоколом анализа. Приготовьте разведения образцов не ранее чем за 60 минут перед использованием и тщательно перемешивайте их перед внесением в лунки.

Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре. После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по **50 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки.

Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл ферментного конъюгата АК** в каждую лунку, кроме лунок A1/A2.

Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре.

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 4.

Внесите по **100 мкл раствора субстрата TMB S** в каждую лунку, включая лунки A1/A2.

Инкубируйте в течение **15 минут в темноте при комнатной температуре**.

После окончания инкубации внесите по **100 мкл стоп-раствора SL** в каждую лунку, включая лунки A1/A2.

Измерьте оптическую плотность при **450 нм** не позднее чем через **30 минут после внесения стоп-раствора** (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0.20, а значение ОП стандарта G было выше 1.00.

Образцы, для которых получены значения ОП выше значения ОП стандарта G, не попадают в диапазон измеряемых значений. Для получения достоверных значений такие образцы необходимо развести дополнительно и протестировать еще раз.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями hIGFBP-1

Стандарт	A	B	C	D	E	F	G
нг/мл	0	0.1	0.5	1	2	4	8

1) Рассчитайте среднее значение ОП (МА) дублей бланка (лунки A1/A2).

2) Вычтите полученное среднее значение (МА) бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех других образцов, стандартов и контролей.

3) Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

4) Рекомендации: расчет калибровочной кривой необходимо выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычно калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы полиномы более высокой степени или четырёхпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия (сплайн, построение от точки к точке).

5) Концентрация IGFBP-1 в образцах, в нг/мл, может быть определена как произведение значения, полученного из калибровочной кривой, на соответствующий коэффициент разведения.

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

концентрация IGFBP-1 в образцах сывороток 69 здоровых взрослых доноров была определена с помощью данного метода Mediagnost ELISA E01. Была выявлена слабая гендерная разница, концентрации во всех образцах лежали в диапазоне от 0.23 нг/мл до 17.94 нг/мл (см. таблицу 5).

Таблица 5: Ожидаемые значения в образцах сывороток здоровых взрослых людей (значения, измеренные нг/мл)

Пол	Кол-во образцов	Среднее значение	Медиана	Min. – Max.:
Мужчины	33	4.79	4.24	0.23 – 16.07
Женщины	36	5.22	2.71	0.42 – 17.94
Всего	69	5.01	2.77	0.23 – 17.94

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

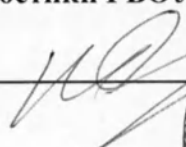
т./факс (495) 647-2740 (многоканальный),

email: info@biochemmack.ru

СОГЛАСОВАНО»

ав. кафедрой клинической лабораторной

диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор


Долгов В.В.
 Российская медицинская академия последипломного образования Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации
 Специалист по кадрам РМАПО
 Подпись _____
 " ____ " ____ 20__ года

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2012г.

**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения белка связывающего инсулин-подобный фактор роста-II
(IGFBP-2 – ELISA)**

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Измерение концентрации общего IGFBP-2 в сыворотке, плазме крови и других биологических жидкостях человека;
- Одиночные стандарты 2; 10; 20; 40 и 80 нг/мл;
- Общее время инкубации только 1 час 45 минут;
- Две контрольные сыворотки для проведения контроля качества в соответствии с «хорошей лабораторной практикой»;

набор реагентов готов к использованию;

требуется проведения экстракции образцов;

микротитровальный планшет состоит из 8-луночных «ломаемых» стрипов.

сфера применения – клиническая лабораторная диагностика.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Уровень IGFBP-2 в плазме крови зависит от возраста (3). Для данного анализа были определены референсные значения у здоровых лиц (от 1,5 лет и старше 70 лет).

Так же как IGFBP-3, IGFBP-2 является дополнительным маркером нарушения роста (отношение IGFBP-2/IGFBP-3), IGFBP-2 обладает ингибиторными эффектами на соматотропин (3,4).

Маркер прогрессирования лейкемии (5), опухоли звездчатых клеток ЦНС (6,7), карциномы простаты (8), коры надпочечников (9) гепатоцеллюлярной карциномы (10) и других.

Антивозрастной параметр: IGFBP-2 как маркер физиологического состояния организма (20).

ВВЕДЕНИЕ

Инсулин – подобные факторы роста (IGFs) I и II типов регулируют пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, клеточную адгезию и метаболизм в различных тканях и типах клеток. IGF-I, который синтезируется в основном в печени, под влиянием соматотропина (GH), регулирует линейный рост костей и процесс полового созревания, в то время как IGF-II главным образом является фактором роста эмбриональной ткани (11-13). Биологические эффекты IGF очень разнообразны и зависят от типа рецептора, с которым данный гормон связывается (IGFBP-1 - 6) (14). IGFBP-2 является вторым, после IGFBP-3, по частоте встречаемости в плазме крови человека. IGFs, особенно специфичный для опухоли пропептид IGF, а также опухолевые гормоны регулируют уровень экспрессии гена IGFBP-2, что приводит к ингибированию эффектов гормона роста. Предполагают, что на клеточном уровне IGFBP-2 стимулирует быстрое увеличение и распространение солидных опухолей за счет механизмов, независимых от IGF (15,16).

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

IGFBP-2 – негликозилированный полипептид (молекулярный вес составляет 31.3 kDa), который формирует двойные комплексы с IGF. Циркадных изменений уровня IGFBP-2 в крови не обнаружено. Увеличение концентрации IGFBP-2 в сыворотке крови обнаружено после голодания, больших хирургических вмешательств, травмы, но наиболее выраженное повышение уровня

IGFBP-2 выявлено у пациентов со злокачественными новообразованиями. При изучении различных типов опухолей выявлены корреляции уровней IGFBP-2 со степенью прогрессирования опухоли, а также нормализация уровней IGFBP в сыворотке крови после наступления стойкой ремиссии (5 - 10). У низкорослых пациентов при лечении гормоном роста и обследованных, злоупотребляющих гормоном роста (допинг), обнаружено снижение уровня IGFBP-2. В сыворотке крови матери, родивших детей с трисомией по 18 хромосоме, с обнаружено снижение уровня IGFBP-2 и повышение уровня IGFBP-1. Поэтому отношение IGFBP-2/IGFBP-1 является перспективным маркером трисомии по 18 хромосоме (17).

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения IGFBP-2 человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы крови, а также в спинномозговой жидкости, грудном молоке, амниотической жидкости, слюне и культуральной среде.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

		Реагент
1)	MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к IGFBP-2, в пакете.
2)	CA L	Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат IGFBP-2 человека. Концентрации стандартов в диапазоне 2-80 нг/мл (2, 10, 20, 40 и 80 нг/мл) рекомбинантного IGFBP-2 человека. Стандарты (каждый) должны быть растворены в 750 мкл буфера для разведения VP .
3)	BUF VP	Буфер для разведения VP , 25 мл, готов к использованию.
4)	Contr ol	Контрольные сыворотки KS1 и KS2 , по 250 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 100 мкл буфера для разведения VP. Требуемый уровень и допустимые значения IGF-I указаны на этикетках флаконов.
5)	Ab Conj	POD конъюгат -антител АК , 12 мл, готов к использованию, содержит смесь биотинилированных антител к IGF-I и конъюгата HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
6)	WASH BUF 20x	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7)	SUBS T	Субстратный раствор (S) , 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
8)	H ₂ SO 4	Стоп-раствор (SL) , 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)		Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками

- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
3. Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры 20-25°C. При наличии преципитатов в буферах их перед использованием растворите их при перемешивании и согревании.
4. Не смешивайте реагенты разных серий. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
5. Микропланшет содержит «ломаемые» стрипы в рамке – держателе. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при 2-8°C в металлизированном пакете.
6. Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами. Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один: **AK, VP**.
R34 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи
R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей
S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу
S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки
S45 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу
Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один: **AK, VP, WP**.
R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи
R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей
S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу
S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды
Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H₂SO₄)
R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи
S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу
S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды
S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки
7. Вносите образцы и реагенты с максимально возможной скоростью, с постоянной последовательностью на разных этапах.
8. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации.
9. Используйте отдельные емкости для каждого реагента. Это особенно важно для емкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата,

может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов!

10. Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения промывки.

Субстрат ТМВ (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

R20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

R36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей и оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E05 определения IGFBP-2 основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. IGFBP-2, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к IGFBP-2 и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с IGFBP-2, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества IGFBP-2 в образце.

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки, плазмы крови и другие биологические жидкости, такие как грудное молоко, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость и слюна, а также культуральная среда. Сбор образцов крови для получения сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Образцы желательно хранить без антикоагулянтов. Избегайте использования для анализа сильно гемолизированных образцов. Оставьте образцы для образования сгустка, после чего отделите сыворотку центрифугированием. Сбор образцов можно проводить в любое время суток. Если образцы не будут протестированы в день сбора их можно хранить при 2-8⁰С в течение 2 суток и при -20⁰С или ниже в течение 2 лет в плотно закрытых пробирках. Хотя проведение нескольких циклов замораживания/оттаивания не оказывало влияния на

результаты определения IGFBP-2, избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания (при необходимости образцы аликвотируйте).

В большинстве случаев (при тестировании сыворотки или плазмы крови, при отсутствии значительно повышенных уровней IGFBP-2) рекомендовано проводить разведение от 1:10 до 1:30 буфером для разведения VP. В соответствии с ожидаемыми значениями концентрации IGFBP-2 разведение может быть большим или меньшим.

Для клинических исследований сыворотки или плазмы крови рекомендовано проводить стандартное разведение 1:21. Предложения по проведению разведения.

Например, в пробирку типа Эппендорф с 300 мкл буфера для разведения (VP) внесите 15 мкл сыворотки или плазмы (разведение 1:21) (при проведении большой серии разведений рекомендуем использовать многоканальные пипетки). После перемешивания используйте 2x100 мкл этого разведения образцов (1:21) для анализа или внесите в лунки микропланшета 100 мкл буфера и добавьте 5 мкл тестируемой сыворотки. Концентрация IGFBP-2 в других биологических жидкостях человека, нежели сыворотка или культуральная среда, может существенно отличаться (см. таблицу 5).

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Микропланшет и реагенты, входящие в состав набора стабильны в течение всего срока хранения при хранении в темноте при 2-8⁰С (см. этикетку).

Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры. При образовании преципитатов в буфере аккуратно растворите их при нагревании и перемешивании.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20-25⁰С.

Стандарты и контроли

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфер VP для разведения образцов. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе. Растворенные стандарты и контроли могут храниться 2 месяца при -20⁰С.

Буфер для промывок

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20x буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2-8⁰С. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры.

Субстрат

Субстратный раствор S, стабилизированный H₂O₂ - тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и инкубируйте в темноте.

Микропланшет

Храните стрипы при 2-8⁰С в металлизированном пакете с осушителем. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут).

Все инкубации проводите при комнатной температуре (20-25⁰С)!

Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, ферментный конъюгат антител АК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

- 1) Внесите в первые лунки (A1/A2) по **100 мкл** буфера для разведения VP (бланк). Внесите в соответствующие лунки по **100 мкл** каждого стандарта, разведенных контрольных сывороток (KS1 и KS2) и разведенных образцов.
- 2) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **1 часа при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

- 3) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по **250 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки. Желательно, чтобы инкубация с буфером для промывок WP длилась не менее 15 секунд на цикл.
- 4) Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл POD конъюгата антител АК** в каждую лунку. Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **30 минут при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).
- 5) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза **буфером для промывок WP**, как это показано в п. 3.
- 6) Внесите по **100 мкл субстратного раствора S** в каждую лунку.
- 7) Инкубируйте в течение **15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C)**.
- 8) После окончания инкубации внесите по **100 мкл стоп-раствора SL** в каждую лунку.
- 9) Измерьте оптическую плотность **при 450 нм** не позднее чем через **30 минут** после внесения **стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм)**.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,25, а значение ОП стандарта Е было выше 1,0. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации IGFBP-2 может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями рекомбинантного IGFBP-2 человека.

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	2	10	20	40	80

- 1) Рассчитайте **среднее значение ОП** дублей бланка (лунки A1/A2).
- 2) Вычтите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.
- 3) Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).
- 4) Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы **полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия** (сплайн, построение от точки к точке).
- 5) Концентрация IGFBP-2 в образцах измеряется в нг/мл и вычисляется при умножении значения полученного из калибровочной кривой **на фактор разведения**.

На рисунке представлен пример построения калибровочной кривой. Не используйте для подсчета результатов при проведении анализа. Калибровочную кривую необходимо строить при каждом проведении анализа!

Пример подсчета концентрации IGFBP-2 в неразведенных образцах.

ОП в тестируемом образце 0,37

ОП в бланке 0,06

Программное обеспечение позволяет автоматически вычислить концентрацию IGFBP-2 в разведенном образце, используя разницу ОП в образце и бланке. Для определения концентрации IGFBP-2 используйте наиболее подходящую калибровочную кривую (здесь: полиномиальную, трехуровневую).

В данном примере для вычисления концентрации IGFBP-2 в образце программным обеспечением предложено следующее уравнение:

$$0.31 = -0.0012048 + 0.039581x + 5.1788 * 10^{-0,005} * x^2 - 1.8929x * 10^{-0,06} * x^3$$

7.93 = x

так как образец неразведенный, то концентрация IGFBP-2 составила $7.93 \cdot 21 = 166.55$ нг/мл.

калибровочная кривая IGFBP-2

Гр. 1: $y = -0.0012048 + 0.039581 \cdot x + 5.1788 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 1.8929 \cdot 10^{-6} \cdot x^3$ $d = 0.002916$

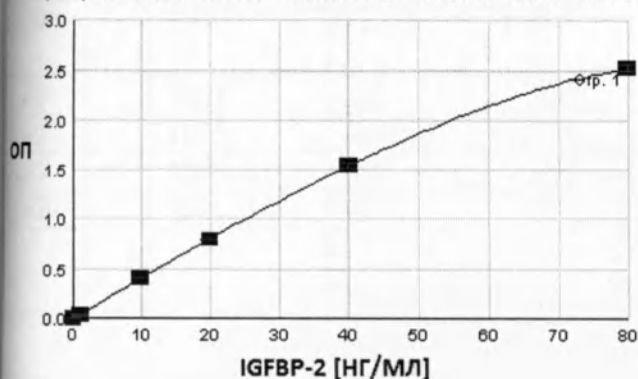


Рисунок 1. Пример калибровочной кривой.

ВАЛИДАЦИЯ

Стандарты

В наборе ELISA E05 используются стандарты IGFBP-2 в концентрациях **2; 10; 20; 40 и 80 нг/мл**.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E05 составляет $< 0,2$ нг/мл ($2 \times \text{SD}$ при тестировании нулевого стандарта).

Специфичность

Данная тест-система высоко специфична для IGFBP-2 человека. Обнаружена слабая перекрестная реакция с IGFBP-2 собаки, лошади, осла, кошки и козы. Не выявлено перекрестной реакции с IGFBP-2 свиньи, быка, кролика, мыши, курицы, крысы, морской свинки, овцы.

Также нет перекрестной реакции с IGFBP-1 и IGFBP-3.

Интерференция

Проведено изучение интерференции IGFBP-2 с билирубином и триглицеридами. Образцы сыворотки были обогащены данными соединениями и протестированы на содержание IGFBP-2. Полученные результаты сравнили с результатами определения IGFBP-2 в необогащенных образцах. В таблице 1 представлены результаты сравнения. Ни билирубин, ни триглицериды не влияли значимо на результаты определения IGFBP-2.

Таблица 1. Интерференция.

Билирубин		Триглицериды	
(мкг/мл)	% от контроля	(мкг/мл)	% от контроля
25	95.07	12.5	100.79
50	92.80	25	101.01
100	93.83	50	103.65
200	88.15	100	101.34

Извлечение

Сыворотка крови человека была обогащена рекомбинантным IGFBP-2 в трех различных концентрациях. По концентрации IGFBP-2 в образцах определено относительное извлечение в сравнении с буфером, которое в среднем составило 108%.

Некоторые полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Извлечение рекомбинантного IGFBP-2 в сыворотке крови человека.

IGFBP-2 (нг/мл)	+1000 нг/мл	+500 нг/мл	+100 нг/мл	Среднее (нг/мл)
% извлечения	100,00	112,00	114,00	108,67

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 10%. Типичные примеры определений приведены в таблице 3 и таблице 4.

Таблица 3. Воспроизводимость между сериями.

Разведение	Сыворотка 1 нг/мл	Сыворотка 2 нг/мл	Спинно- мозговая жидкость	Амниоти- ческая жидкость
1:10	938	582	426	Не определялась
1:20	1061	673	428	460
1:40	1055	719	379	483
1:80	1004	691	318	431
1:160	952	668	426	415

Таблица 4. Воспроизводимость внутри серии.

	322	375	298	305	318	311	320	325	302	301	305	317
Образец 1 нг/мл												
Образец 2 нг/мл	612	609	616	648	594	597	620	613	617	611	636	698

Таблица 5. Линейность при разведении образцов.

Образец (нг/мл)	1	137	159	152
Образец (нг/мл)	2	672	697	688
Образец (нг/мл)	3	928	929	956

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрация IGFBP-2 в сыворотке крови зависит от возраста (Таблица 8) и от индекса массы тела (ИМТ, таблица 7). Для выявления референсных значений были изучены уровни IGFBP-2 в сыворотке крови более чем 400 здоровых детей и взрослых (см. таблицу 8, рисунок 2) (3).

Пожалуйста, см. ожидаемые нормальные значения для концентрации IGFBP-2 в других биологических жидкостях человека, нежели сыворотка крови, а также в культуральной среде в таблице 6.

Ограничение исследований

Отклонение от референсных значений IGFBP-2 может ожидать у пациентов с гипотиреозом, а также после больших хирургических вмешательств, при множественной травме, сахарном диабете (вследствие проведения терапии инсулином), голодании, злокачественных новообразованиях.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 6. Ожидаемые нормальные значения IGFBP-2 в биологических жидкостях человека и культуральной среде.

Образец	Ожидаемые нормальные значения (нг/мл)
сыворотка	(100–1000)
спинномозговая жидкость	(100–300)
амниотическая	(200–10000)

жидкость	
семенная плазма	(5000–15000)
грудное молоко	(1500-3000)
культуральная среда	(5–300)

Таблица 7. Ожидаемые нормальные значения в зависимости от ИМТ у взрослых в возрасте 20 – 80 лет.

ИМТ (кг/м ²)	Перцентиль					
	n	IGFBP-2 (нг/мл)	SD	5	50.	95.
15	12	612	110	431	612	793
17,5	14	568	126	361	568	775
20	76	509	144	271	509	746
22,5	124	449	162	182	449	716
25	101	398	165	127	398	670
27,5	52	348	147	106	348	590
30	25	315	118	120	315	510
32,5	15	282	90	135	282	430
35	4	251	80	119	251	383
37,5	4	220	71	104	220	336

Таблица 8. Уровни IGFBP-2 в сыворотке крови (в нг/мл) в зависимости от возраста (5, 50 и 95 перцентили).

Ожидаемые нормальные значения IGFBP-2 в зависимости от возраста.

Возраст (лет)	5 перцентиль, нг/мл	50 перцентиль, нг/мл	95 перцентиль, нг/мл
1	408	545	728
2	359	500	696
3	317	460	668
4	277	421	640
5	243	388	617
6	217	361	602
7	194	336	583
8	173	312	562
9	154	289	542
10	138	268	522
11	123	249	503
12	111	232	486
13	101	219	477
14	94	212	470
15	89	207	465
16	86	207	460
17	84	214	466
18	84	223	483
19	84	232	500
25	99	280	580
35	110	381	686
45	130	403	702
55	140	410	715

Всего прошито

и пронумеровано

10 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Татьяна Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ОАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2012г.



**Иммуноферментный набор реагентов для количественного определения Белка-3, связывающего инсулиноподобные факторы роста (IGFBP-3).
Производитель: «Медиагност ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).**

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Количественное определение IGFBP-3 без предварительной подготовки образцов
- Воспроизводимость внутри серии 6.30% и воспроизводимость между сериями 4.51%
- Чувствительность 0.1 нг/мл
- Измерение гормон роста (GH)-зависимого IGFBP-3 связывающего белка
- В набор входят 2 контрольные сыворотки для контроля качества исследований, в соответствии с правилами хорошей лабораторной практики (GLP)
- Стабильность уровня в сыворотке, отсутствие колебаний концентрации в кровотоке.
- Определяет секреторный статус GH за последнее время
- Даже единичное измерение высоко информативно в целях диагностики дефицита GH или избытка GH

хорошо подходит для диагностики дефицита GH у детей

тестирования требуется небольшое количество образца, метод может быть использован для определения у детей.

сфера применения – клиническая лабораторная диагностика.

ПРИМЕНЕНИЕ

В кровотоке инсулиноподобные факторы роста (IGF)-I и -II связываются со специфическими связывающими белками (IGFBPs). К настоящему моменту известны шесть связывающих белков, различающихся по своей аминокислотной последовательности. Они названы IGFBP-1, IGFBP-2, ... IGFBP-6 (1). В последнее время обсуждается открытие нового, седьмого белка, IGFBP-7 (2). В крови основным IGFBP является IGFBP-3, который в значительной степени определяет концентрацию общего IGF-I и IGF-II. В отличие от остальных связывающих белков, IGFBP-3 обладает уникальным свойством связываться с кислото-неустойчивой несвязывающей субъединицей (ALS) после связывания и с IGF-I, и с IGF-II (3-5). Большая часть IGFBP-3 в плазме присутствует в виде высокомолекулярного трёхкомпонентного комплекса, однако, выявляются и небольшие количества свободного IGFBP-3 (6,7). Разработка специфического иммуноферментного метода определения IGFBP-3, распознающего в том числе высокомолекулярный комплекс, предоставляет новые возможности его применения в диагностике его регуляции (6-9). На основании этих исследований уровень IGFBP-3 в сыворотке считается значимым маркером в диагностике нарушений роста (7,8).

Кроме GH, несколько других факторов влияют на уровень IGFBP-3: возраст, включая половое развитие, питание, гипотиреоз, сахарный диабет, функции печени и почек. Уровень IGFBP-3 снижается при нарушениях питания, хотя и в меньшей степени, чем IGF-I, при гипотиреозе, при сахарном диабете и нарушении функции печени (6-8), и повышается при хронической почечной недостаточности (6,10,11). Измерения в течение 24 часов показали отсутствие суточных изменений его уровня в кровотоке. (12,13). С клинической точки зрения наиболее важным фактором регуляции является GH. Единичное измерение IGFBP-3 коррелирует в значительной степени с логарифмом интегрированной спонтанной секреции GH (8,14). У больных с дефицитом GH, уровень IGFBP-3 субнормальный и постепенно повышается до нормальных значений в течение нескольких дней после введения GH (7,8). Медленный ответ на GH и постоянный суточный уровень при ежедневном применении (13) свидетельствуют о том, что IGFBP-3 отражает GH секреторный статус.

До настоящего момента для скрининга дефицита ГН или акромегалии широко использовалось определение сывороточного уровня IGF-I.

Однако, имеются несколько очевидных ограничений:

1. Нормальные значения IGF-I у детей низкие, что значительно затрудняет определение субнормальных уровней в этом возрасте.

2. У значительного числа детей с низкорослостью, несмотря на нормальную секрецию ГН, определяется субнормальный уровень IGF-I. Таким образом, специфичность, и, следовательно, точность такого теста для диагностики дефицита ГН ограничены.

Основные преимущества определения IGFBP-3 по сравнению с тестом IGF-I:

1. Перед тестированием не требуется предварительной экстракции образца (в некоторых методах определения IGF-I это необходимо), это повышает точность измерений и упрощает выполнение теста.

2. Нормальные значения у детей относительно высокие, что делает определение субнормальных уровней более достоверным.

3. У пациентов с дефицитом ГН субнормальный уровень IGFBP-3. Наоборот, у большинства детей с низкорослостью, с нормальной секрецией ГН уровень IGFBP-3 нормальный (рис. 1). Дифференцировать эти две группы легко. Единичного определения концентрации IGFBP-3 достаточно для диагностики дефицита ГН с высокой точностью (7,18). У детей с низкорослостью уровень IGFBP-3 повышается до нормальных значений в течение нескольких дней после введения ГН и остаются в норме на протяжении терапии ГН (рис. 2). Таким образом, определение уровня IGFBP-3 в сыворотке также может быть использовано для оценки ответа больных на введение ГН и на терапию ГН (19). У других пациентов с тяжелой низкорослостью, например, синдромом Ульриха-Тернера или синдромом Рассела-Сильвера, уровень IGFBP-3 нормальный (8), что отражает нормальную секрецию ГН.

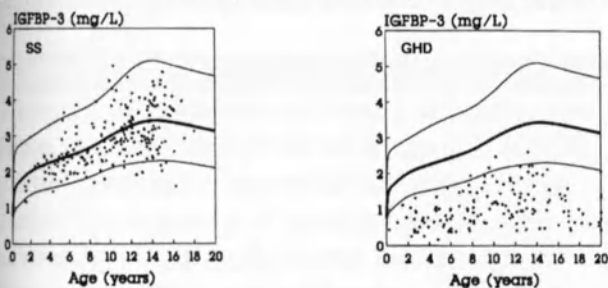


Рис. 1: Уровни IGFBP-3 в сыворотке у больных с низкорослостью, без дефицита ГН (SS: конституциональная задержка роста и полового созревания, наследственная низкорослость, внутриутробная задержка развития) и при идиопатическом или органическом дефиците ГН (GHD). Нормальные значения приведены для 5th, 50th и 95th процентилей.

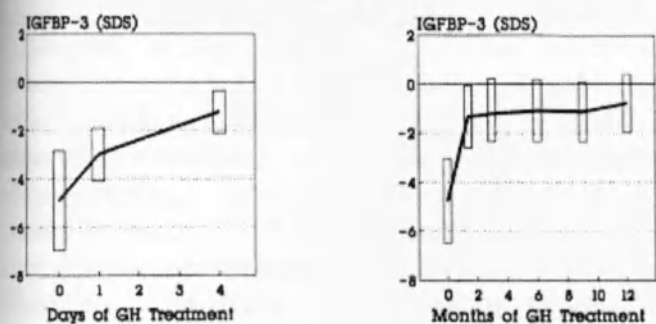


Рис. 2: Уровни IGFBP-3 у детей с дефицитом ГН, перед и во время терапии ГН. Так как концентрация зависит от возраста, значения даны как среднее индексов стандартного отклонения (SDS).

У детей с нормальным ростом и половым развитием, без избыточной секреции ГН, или у пациентов с синдромом Сотаса, уровень IGFBP-3 нормальный или слегка повышенный. Наоборот, у детей с гипофизарным гигантизмом или у взрослых с акромегалией уровень значительно повышен (рис. 3) (6,15), и нормализуется при успешной терапии. Таким образом, IGFBP-3 может быть использован для выявления гиперсекреции ГН и мониторинга терапии. При преждевременном половом созревании уровень IGFBP-3 значительно повышен по сравнению с нормальным для соответствующего биологического возраста ребенка.

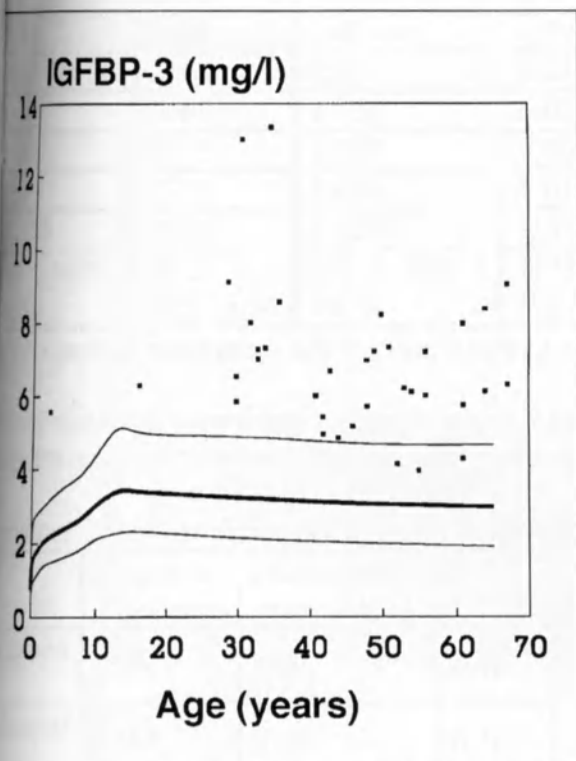


Рис. 3: Уровни IGFBP-3 в сыворотке при акромегалии. levels in acromegaly. Нормальные значения приведены для 5th, 50th и 95th процентилей.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения IGFBP-3 в образцах человеческой сыворотки гепариновой плазмы или спинномозговой жидкости (СМЖ), в диагностических и научных целях.

Диагностическая значимость теста для скрининга дефицита ГН основывается на высокой чувствительности и специфичности определения уровня IGFBP-3 как диагностического параметра. Состояния с гиперсекрецией ГН также могут быть выявлены, по увеличению концентрации IGFBP-3. Благодаря постоянному уровню в течение суток, определения IGFBP-3 в единичном образце крови может быть достаточно для скрининга таких патологий, перед направлением пациента на дополнительное тестирование секреции ГН. Определение IGFBP-3 также может быть использовано для мониторинга эффективности терапии и ответ на лечение при дефиците ГН и акромегалии.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA определения IGFBP-3 кат. № E03A основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. IGFBP3, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические анти-IGFBP-3 антитела и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с IGFBP-3, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества IGFBP-3 в образце. В качестве стандартов в наборе ELISA E03A используется человеческий IGFBP-3 с концентрациями 0.4; 2; 6; 15 и 30 нг/мл.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E03A составляет 0.1 нг/мл (2 SD при тестировании 18 повторов нулевого стандарта).

Таблица 1: Линейность

Разведение:	Образец 1 (расчет., нг/мл)	Разведение:	Образец 2 (расчет., нг/мл)
1:20	3250	1:20	3078

1:40	3489	1:40	3179
1:80	3181	1:80	3221
1:160	3167	1:160	3402
1:320	3013	1:320	3066
1:640	2936	1:640	2901
1:1280	2895	1:1280	3364
AV / 1SD / VC%	3133 / 205 / 6,54	AV / 1SD / VC%	3173 / 176 / 5,55

AV = среднее значение, SD = стандартное отклонение; VC = коэффициент вариации.

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 6.30 % и 4.51 %. Типичные примеры определений приведены в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2: воспроизводимость между сериями.

	Среднее значение	стандартное отклонение	VC
Образец 1	2568	148	5.76
Образец 2	3334	210	6.30
Образец 3	4082	233	5.70

Таблица 3: воспроизводимость внутри серии.

	Среднее значение	стандартное отклонение	VC
Образец 1	1764	76.6	4.34
Образец 2	2260	98.5	3.96
Образец 3	3699	167.0	4.51

Клиническая валидация была выполнена определением уровня IGFBP-3 у большого количества нормальных детей и взрослых, нормальных низкорослых детей без дефицита GH, девочек с синдромом Ульриха-Тернера, детей с синдромом Рассела-Сильвера, больных с дефицитом GH, детей с семейным гигантизмом, синдромом Сотоса, больных с акромегалией, девочек с преждевременным телархе и преждевременным половым созреванием (таблица. 4; Abb. 1, 2, 3, 4 и 5).

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки, гепариновой плазмы и спинномозговой жидкости (СМЖ). Специальная предварительная пробоподготовка не требуется. Результаты при тестировании цитратной или ЭДТА плазмы снижены примерно на 15%. Незначительный гемолиз в образцах не влияет на тестированием данным методом.

Образцы необходимо приготовить согласно обычным рекомендациям: как можно быстрее отделить и охладить. Если между сбором образца и тестированием требуется хранить образец длительное время, храните неразведенные образцы замороженными при -20°C или ниже, в плотно закрытых пробирках.

В принципе, необходимо избегать повторных циклов замораживания/оттаивания сыворотки/плазмы (если необходимо, аликвотируйте образец перед замораживанием), хотя показано, что на уровень IGFBP-3 не влияют повторные (до 5) замораживания/оттаивания.

Высокая чувствительность метода позволяет выполнять определение IGFBP-3 в маленьких объемах образца, при этом объем ограничен возможностью точного пипетирования, а не количеством IGFBP-3. В большинстве случаев (например, при тестировании образцов сыворотки или плазмы, когда не ожидаются экстремальные значения) может быть выполнено разведение 1:505 буфером PP для разведения образцов, при этом соответствующий диапазон определяемых значений составит 0.2 - 15.15

мг/л. При необходимости, в зависимости от ожидаемых значений IGFBP-3, может быть выполнено большее или меньшее разведение в буфере РР для разведения образцов. Концентрация IGFBP-3 может значительно различаться в биологических жидкостях человеческого происхождения, отличных от сыворотки, или в супернатантах клеточных культур.

Рекомендуемый протокол разведения:

Внесите **1 мл буфера РР для образца** (окрашен в красный цвет) в пробирки РЕ-/РР- (при тестировании большого количества образцов рекомендуется использовать мультистеппер), затем внесите **10 мкл образца сыворотки или плазмы** (разведение 1:101). Внесите 400 мкл буфера РР для образца в другую пробирку РЕ-/РР- и 100 мкл тщательно перемешанного разведения, выполненного в первой пробирке (разведение 1:5). После тщательного перемешивания используйте **50 мкл** полученного разведения 1:505 течение 1 часа после приготовления на одно определение данным методом (на одну лунку) (контроль ингибирования = красное окрашивание раствора в лунке).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

		Реагент
1)	MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к IGFBP-3 человека, в пакете.
2)	CA L	Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат человеческий IGFBP-3. Концентрации стандартов в диапазоне 0.4 – 30 нг/мл (0.4, 2, 6, 15 и 30 нг/мл) IGFBP-3, стандарты должны быть растворены в 1 мл буфера РР для образцов. Используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
3)	BUF VP	Буфер для разведения VP, 30 мл, готов к использованию, используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
4)	BU F PP	Буфер РР для образцов , 120 мл, готов к использованию, окрашен в красный цвет, используйте для растворения стандартов (А-Е) и контролей , и для разведения образцов и контролей
5)	Contr ol	Контрольные сыворотки KS1 и KS2, 250 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 250 мкл буфера РР для образцов. Допустимые значения IGFBP-3 указаны на этикетках флаконов. Выполняйте разведения в соответствии с разведением исследуемых образцов. Используйте по 50 мкл на лунку в анализе.
6)	Ab CONJ	Конъюгат-HRP АК, 12 мл, готов к использованию, содержит смесь биотинилированных анти-IGFBP-3 антител и конъюгата HRP (пероксидаза хрена)-стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
7)	WASH BUF 20x	Буфер для промывок (WP), 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен 1:20 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
8)	SUBS T	Субстратный раствор (S), 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
9)	H ₂ SO 4	Стоп-раствор (SL), 12 мл, готов к использованию, 0.2 М серная кислота. Внимание: кислота!

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник (2-8°C). Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и, если набор используется для нескольких постановок, исключении контаминации во время предыдущего использования, гарантируется качественная работа реагентов.

СБОР ОБРАЗЦОВ

Для анализа могут использоваться супернатант клеточных культур, человеческая сыворотка или другие биологические жидкости. Отделите сыворотку от сгустка после свёртывания крови как можно быстрее.

Обратите внимание на возможный «Хук-эффект» при высокой концентрации аналита в образце (см. главу 11).

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо отделить от него до анализа. Не используйте гемолизированные или липемические образцы.

Клинические образцы должны храниться при 2° - 8°C и быстро разделены перед замораживанием и хранением при -20°C для предотвращения потери биоактивности sCD26. Если анализ будет выполнен в течение 24 часов после сбора образцов, то они могут храниться при 2-8°C (стабильность образцов описана в главе 13.5).

Избегайте повторных циклов замораживания - размораживания образцов. Перед тестированием замороженные образцы необходимо медленно довести до комнатной температуры и тщательно перемешать.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Градуированные пипетки на 5 - 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками к ним.
- пипетки на 50 – 300 мкл
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Не смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшет и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2 – 8°C.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20 - 25°C). Если в буферах образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20-25°C

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфера РР для образцов. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 3 месяца при -20°C. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания. Перед использованием замороженных стандартов их необходимо

что разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание вortex), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20х буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2-8°C.

РАСТВОР СУБСТРАТА

Раствор субстрата S, стабилизированный H₂O₂-тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и транспортируйте в темноте.

МИКРОПЛАНШЕТ

Храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при 2-8°C, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на наборе.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.

Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.

Температура влияет на абсорбцию реагентов. Однако это не влияет на значения, получаемые для образцов пациентов.

1. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

2. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации. Используйте отдельные ёмкости для каждого реагента. Это особенно важно для ёмкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов! Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения этапа промывки.

6. Внимание: данный набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения.

Человеческая сыворотка

Содержится в следующих компонентах: контрольные сыворотки KS1 и KS2.

Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Стоп-раствор содержит 0.2 М серную кислоту (H₂SO₄)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

2-метил-4-изотиазолин-3-один

содержится в следующих компонентах: АК, VP, PP

< 0.01% раствор 2-метил-4-изотиазолин-3-один

R34 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

S45 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу.

5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

содержится в следующих компонентах: АК, VP, WP, PP

< 0.01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

638 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

6 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

38.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды.

Субстрат TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин.

20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

6/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

6 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

38.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

6/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду и обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки загрязненных поверхностей и оборудования соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли и образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, **конъюгат антитела-POD АК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL** необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

1) Внесите по все лунки, предназначенные для текущей постановки, по **50 мкл буфера для разведения VP**.

2) Внесите по **50 мкл буфера PP для образцов** в лунки A1/2.

3) Внесите по **50 мкл стандарта A (0.4 нг/мл)**, в лунки B1/2 **50**,

Внесите по **50 мкл стандарта B (2 нг/мл)**, в лунки C1/2

Внесите по **50 мкл стандарта C (6 нг/мл)**, в лунки D1/2,

Внесите по **50 мкл стандарта D (15 нг/мл)**, в лунки E1/2,

Внесите по **50 мкл стандарта E (30 нг/мл)**, в лунки F1/2.

Для контроля правильности постановки внесите по **50 мкл разведения 1:505** (или другого разведения, соответствующего разведению образцов) в буфере **PP** для образцов **контрольных сывороток KS1 и KS2** в лунки G1/2 и H1/H2.

Внесите по **50 мкл каждого разведенного образца** (обычно рекомендуемое разведение 1:505 в буфере **PP** для образцов) в оставшиеся лунки, в соответствии с протоколом анализа. Приготовьте разведения образцов не ранее чем за 60 минут перед использованием и тщательно перемешивайте их перед внесением в лунки.

4) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре (без шейкирования).

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, используя по 250 мкл буфера для промывок WP на лунку на один цикл промывки.

Немедленно после последнего цикла промывки внесите по 100 мкл конъюгата антитела-POD АК в каждую лунку.

Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре (шейкирования).

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 5 раз, как это указано в п. 5.

Внесите по 100 мкл раствора субстрата TMB S в каждой лунке.

Инкубируйте в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре.

После окончания инкубации внесите по 100 мкл стоп-раствора SL в каждую лунку.

Измерьте оптическую плотность при 450 нм не позднее чем через 30 минут после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

АСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0.20, а значение ОП стандарта Е было выше 1.00.

Образцы, для которых получены значения ОП выше значения ОП стандарта Е, не попадают в диапазон измеряемых значений. Для получения достоверных значений такие образцы необходимо развести дополнительно и протестировать еще раз.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями hIGFBP-3

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	0.4	2	6	15	30

- 1) Рассчитайте среднее значение ОП (МА) дублей бланка (лунки A1/A2).
- 2) Вычтите полученное среднее значение (МА) бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех других образцов, стандартов и контролей.
- 3) Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).
- 4) Рекомендации: расчет калибровочной кривой необходимо выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычно калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы полиномы более высокой степени или четырёхпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия (сплайн, построение от точки к точке).
- 5) Концентрация IGFBP-3 в образцах, в нг/мл, может быть определена как произведение значения, полученного из калибровочной кривой, на соответствующий коэффициент разведения. Деление полученного значения на 1000 преобразует значение в мкг/мл, или, эквивалентно мг/л (Пример: измеренное значение составляет 6 нг/мл, образец был разведен в соотношении 1:505, следовательно концентрация в образце $6 \times 505 = 3030$ нг/мл, или 3.03 мкг/мл, или 3.03 мг/л, в зависимости от требуемых единиц).

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень IGFBP-3 сильно зависит от возраста у детей, у взрослых эта зависимость не так выражена. Диапазоны нормальных значений в различных возрастных группах, где были получены log нормальные распределения, приведены в таблице 4 по процентилям (см. приложение).

Графическое представление дано на рис.4 и 5. Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Уровень IGFBP-3 строго зависит от секреции GH. Однако еще многие другие факторы влияют на его уровень в плазме и их необходимо учитывать для правильной интерпретации результатов. Уровень в плазме снижается при голодании (более одного дня 1), при плохом питании, мальадсорбции, кахексии, нарушениях функции печени, гипотиреозе, сахарном диабете. Он может также быть снижен при

ических воспалительных заболеваниях и злокачественных патологиях. Уровень повышается при снижении функции почек или преждевременном половом созревании. При гиперпролактинемии или у пациентов с краниофарингиомой могут наблюдаться нормальные уровни, несмотря на дефицит ГН. В некоторых физиологических (например, беременность) и патологических состояниях, IGFBP-3 может деградировать до соединений с небольшим молекулярным весом (16,17) под действием ферментативских протеаз, которые влияют на паттерн IGFBP, получаемый при анализе методом Вестерн-блоттинга, но обычно лишь незначительно влияют на результаты тестирования методом ИФА. Для изучения данного физиологического процесса может быть использован набор Mediagnost ELISA Функциональный (functional) IGFBP-3, кат. № E04. Этот метод ELISA кат. № E04 позволяет выполнить количественную оценку степени фрагментации IGFBP-3 в образце.

Концентрация в сыворотке
в зависимости от возраста

Дети и подростки

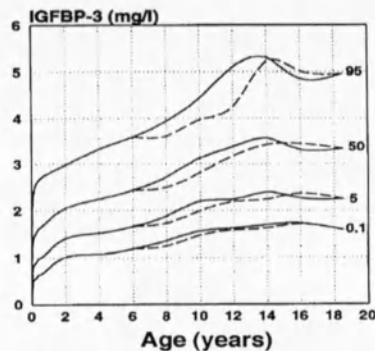
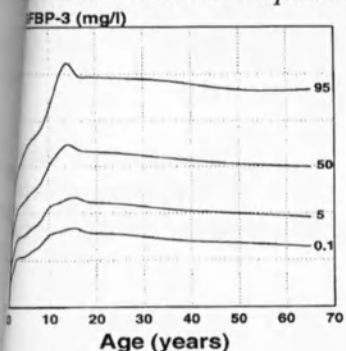


Рис. 4 Нормальные значения IGFBP-3 в зависимости от возраста (представлены как 0.1, 5, 50 и 95 перцентиль).

Рис. 5 Нормальные значения для детей и подростков (девочки —, мальчики ---)

Приложение

Таблица 4: Уровни IGFBP-3 в сыворотке у здоровых людей разных возрастных групп. Группы доноров в возрасте 7 - 17 лет разделены по полу, так как пубертат у девочек наступает обычно примерно на 2 года раньше чем у мальчиков.

Возраст	Процентили													
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-1 неделя	0.25	0.33	0.42	0.48	0.57	0.64	0.70	0.77	0.85	0.93	1.05	1.23	1.41	1.81
1-4 недели	0.49	0.62	0.77	0.86	0.99	1.10	1.19	1.29	1.40	1.52	1.68	1.93	2.16	2.68
1-3 месяца	0.55	0.70	0.87	0.98	1.13	1.25	1.36	1.48	1.61	1.75	1.94	2.23	2.52	3.14
3-6 месяцев	0.64	0.80	0.98	1.10	1.25	1.38	1.49	1.61	1.74	1.88	2.07	2.37	2.65	3.24
6-12 месяцев	0.71	0.88	1.07	1.19	1.35	1.48	1.60	1.72	1.85	2.00	2.19	2.49	2.76	3.36
1-3 года	1.02	1.21	1.41	1.53	1.69	1.82	1.94	2.05	2.17	2.31	2.48	2.74	2.98	3.47
3-5 лет	1.08	1.30	1.52	1.66	1.84	1.99	2.12	2.25	2.39	2.55	2.75	3.05	3.33	3.91
5-7 лет	1.19	1.42	1.66	1.81	2.01	2.16	2.30	2.44	2.59	2.76	2.97	3.29	3.59	4.2
7-9 лет														
Мальчики	1.25	1.48	1.73	1.88	2.07	2.22	2.36	2.50	2.65	2.81	3.02	3.33	3.61	4.22
Девочки	1.36	1.61	1.88	2.04	2.25	2.42	2.57	2.72	2.88	3.06	3.28	3.62	3.94	4.58
9-11 лет														
Мальчики	1.47	1.73	1.99	2.15	2.36	2.52	2.66	2.81	2.96	3.14	3.35	3.67	3.97	4.57
Девочки	1.56	1.90	2.20	2.38	2.62	2.80	2.96	3.13	3.30	3.50	3.75	4.11	4.45	5.16
11-13 лет														
Мальчики	1.58	1.88	2.19	2.38	2.63	2.82	3.00	3.18	3.37	3.58	3.84	4.25	4.62	5.39
Девочки	1.62	1.90	2.24	2.46	2.74	2.97	3.17	3.38	3.60	3.85	4.17	4.65	5.10	6.02

15 лет														
льчики	1.62	1.89	2.24	2.46	2.76	2.99	3.20	3.42	3.65	3.91	4.24	4.75	5.22	6.20
очки	1.69	2.03	2.39	2.61	2.91	3.14	3.35	3.56	3.79	4.04	4.36	4.85	5.30	6.24
17 лет														
льчики	1.70	2.02	2.36	2.57	2.84	3.05	3.25	3.44	3.65	3.88	4.17	4.61	5.01	5.86
очки	1.62	1.93	2.26	2.46	2.73	2.93	3.12	3.31	3.51	3.74	4.02	4.45	4.85	5.67
20 лет	1.58	1.90	2.24	2.45	2.72	2.94	3.13	3.33	3.54	3.78	4.07	4.53	4.95	5.83
30 лет	1.55	1.86	2.20	2.41	2.68	2.90	3.09	3.29	3.50	3.74	4.04	4.50	4.92	5.80
40 лет	1.44	1.75	2.08	2.29	2.56	2.78	2.98	3.18	3.39	3.64	3.95	4.42	4.86	5.78
50 лет	1.38	1.68	2.01	2.21	2.48	2.69	2.88	3.08	3.29	3.53	3.83	4.29	4.72	5.63
60 лет	1.34	1.64	1.96	2.16	2.42	2.63	2.83	3.02	3.23	3.46	3.76	4.22	4.65	5.55
70 лет	1.28	1.58	1.90	2.10	2.37	2.58	2.78	2.98	3.19	3.44	3.75	4.23	4.67	5.62
80 лет	1.20	1.50	1.81	2.00	2.27	2.47	2.67	2.87	3.08	3.32	3.62	4.09	4.52	5.44
90 лет	1.13	1.43	1.73	1.92	2.19	2.39	2.59	2.79	3.00	3.23	3.54	4.00	4.44	5.36

ровни даны в мг/л

пределение IGFBP-3 RIA (Blum et al. 1990)

начения для группы старше 70 лет экстраполированы.

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный),

e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной

диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.



Всего прошито

и пронумеровано

4 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тимошенко



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2012г.

**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения соматотропина (гормона роста человека) human Growth Hormone – ELISA.
Производитель: «Медиagnost ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).**

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

Определение соматотропина человека (hGH) используется для диагностики дефицита соматотропина или его повышенной секреции (развитии акромегалии). При проведении лекарственного или хирургического лечения акромегалии определение уровня соматотропина (вместе IGF-I) может быть использовано для мониторинга эффективности проводимой терапии.

- Тест система Mediagnost hGH ELISA E22 позволяет точно определять концентрацию hGH в сыворотке и плазме крови (нативные образцы, образцы после проведения тестов с активацией и ингибированием синтеза).

- Данная тест-система калибрована с использованием референсной тест-системы на основе радиоиммунного анализа (исследование KIGS/IGLU), работа проведена в Детской клинической больнице университета города Тюбинген, Германия (см. список литературы, 1);

высокой чувствительности (0.25 нг/мл или 250 пг/мл) данная тест-система может быть использована для измерения hGH в супернатанте клеточной культуры и других биологических образцах, помимо сыворотки (например, для оценки уровня экскреции hGH с

необходимости для определения концентрации hGH с высокой чувствительностью можно использовать тест-систему Mediagnost E22 (чувствительность 0.0016 нг/мл или 1.6 пг/мл).

Время проведения анализа: общее время инкубации составляет только 2 часа 15 минут, использованы высоко аффинные моноклональные антитела к рекомбинантному hGH (22 кДа).

Калибровка по рекомбинантному hGH (2-ой Международный стандарт, NIBSC 98/574; см. список литературы, 6)

В комплект тест-набора входят одиночные стандарты (1, 5, 10, 15 и 25 нг/мл hGH), контрольные материалы на основе сывороток крови человека, а также микропланшет, состоящий из ломаемых стрипов.

Сфера применения – клиническая лабораторная диагностика.

Описание

Соматотропин (гормон роста человека (hGH)), или соматотропин является очень сложной структурой. hGH - продукт гена GH-1, расположенного в 17 хромосоме, экспрессируется клетками гипофиза. 80 % продукта экспрессии этого гена составляет негликозилированный белок, состоящий из 191 аминокислоты, молекулярного веса 22 кДа. Остальные 20 % продуктов экспрессии гена представляют разные формы альтернативного сплайсинга, молекулярного веса 20 кДа. Кроме того, в циркуляции могут быть обнаружены еще несколько других разновидностей белка, а также посттрансляционно модифицированных белков и различных видов белковых агрегатов. Кроме того, биологическая активность соматотропина регулируется специфическим связывающим белком (GHBP), который образуется из внеклеточной части клеточного трансмембранного рецептора к hGH. Данные модификации обуславливают жесткий контроль периода полужизни hGH и его биологической активности. GH – очень специфичное соединение.

Не только синтез, но и посттрансляционная модификация, а также и секреция hGH поддаются жесткой регуляции. Обнаружено спонтанное, пульсаторное повышение уровня синтеза hGH каждые три часа, наиболее выраженное увеличение уровня секреции приходится на время ночного сна. Такие факторы, как физические нагрузки, стрессовые ситуации и гипогликемия приводят к активации синтеза гормона гипоталамуса соматотропин-рилизинг фактора (соматолиберина, GHRH) и увеличению секреции hGH. Возраст, половые стероидные гормоны, пищевое поведение, различные заболевания и эмоции также влияют на уровень секреции hGH. Так как существует множество факторов, влияющих на уровень синтеза hGH, нормальные, физиологические его значения не установлены.

Физиологические функции hGH также очень разнообразны. В частности, hGH влияет на функции Инсулин подобных факторов роста (IGFs). У детей и подростков система hGH является ключевым регулятором роста. При полном нарушении функции hGH системы, рост человека может не превышать 120 см. Помимо регуляции роста hGH обладает анаболическим эффектом на мышечную и соединительную ткани, а также на костную ткань и ткани других органов (сердце, кишечник). Кроме того, показано, что hGH обладает липолитическим эффектом. При нарушении синтеза соматотропина обнаружены как очень высокие, так и очень низкие уровни синтеза hGH. У детей дефицит Соматотропина может быть врожденным или приобретенным, что приводит к карликовости. Для диагностики дефицита соматотропина рекомендовано провести тест со стимуляцией синтеза hGH, или исследовать уровень спонтанной секреции. Лечение состоит в проведении заместительной гормональной терапии: эндогенный соматотропин замещается рекомбинантным hGH, что приводит к увеличению роста.

У взрослых дефицит hGH главным образом может развиваться при хирургическом удалении аденомы гипофиза. Дефицит hGH приводит к развитию характерных патологических изменений, аналогичных преждевременному старению (ожирение, дистрофия мышц, артериосклероз, остеопороз, астения).

Заместительная гормональная терапия является общепризнанным, одобренным и эффективным методом лечения выраженного дефицита соматотропина у взрослых. Эффективность терапии может быть непосредственно (а также косвенно) оценена по уровню инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови. Увеличение секреции hGH, главным образом, связанное с наличием аденомы гипофиза, приводит к гигантизму у детей, или формированию акромегалии (увеличению конечностей) у взрослых, а также развитию диабета, сердечной недостаточности и росту опухоли.

Хирургическое удаление аденомы является наиболее предпочтительным методом лечения. Если удаление опухоли невозможно или является неполным, то рекомендовано проведение лекарственной терапии препаратами соматостатина, приводящих к снижению уровня синтеза hGH. Кроме того, в клинической практике используют препараты, блокирующие рецептор hGH, что приводит к ингибированию эффектов hGH.

ПОКАЗАТЕЛИ

Данный метод предназначен для измерения соматотропина человека (hGH) в образцах человеческой сыворотки или плазмы крови, а также в культуральной клеточной среде.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E02 определения hGH основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. hGH, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к hGH и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с hGH, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к окрашиванию жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества hGH в образце.

В качестве стандартов в наборе ELISA E02 используется рекомбинантный человеческий соматотропин с концентрациями 1; 5; 10; 15 и 25 нг/мл (нг/мл эквивалентно 3, 15, 30, 45 и 75 мкМЕ/мл, см. ниже).

В качестве стандартного материала используется второй международный стандарт для hGH, NIBSC Code 98/574 (6). Он был протестирован в 2001 году, использован стандарт в концентрации 3 МЕ/мл. Данный стандарт может быть использован эффективно для стандартизации современных ИФА тест-систем для определения hGH (7, 8).

Извлечение

Извлечение при использовании рекомбинантного hGH в буферном матриксе составило 100%. Извлечение hGH в различных образцах сыворотки крови и мочи человека составило от 94% до 110% от ожидаемых значений.

Линейность

Определение hGH данным методом Mediagnost ELISA E02 достоверно в очень широком диапазоне возможных разведений. Линейность разведения сыворотки очень хорошая в широком диапазоне.

Таблица 1. Линейность при разведении образцов (результаты получены при разведении 3 разных сывороток, уровни пересчитаны в нг/мл).

Разведение:	Образец 1	Образец 2	Разведение:	Образец 1
Разведенный	14.1	11.0	1:30	845.3
1:2	16.5	12.0	1:60	778.5
1:4	16.2	12.2	1:120	732.4
1:8	16.0	12.2	1:240	664.1
1:16	15.1	13.9	1:480	738.0
1:32	14.5	12.8	1:960	733.4
1:64	14.9	12.8		
AV / 1SD	15.3 / 0.92	12.4 / 0.88	AV / 1SD	748.6 / 60.0
VC%	5.98	7.07	VC%	8.01

AV = среднее значение; SD = стандартное отклонение; VC = коэффициент вариации.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E02 составляет < 0,25 нг/мл (эквивалентно 250 пг/мл, 30 пг на лунку; 2xSD нулевого стандарта в 16 повторях).

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 7% и 5%, соответственно. Типичные примеры определений приведены в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 3. Воспроизводимость между сериями.

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC
Образец 1	10	2.57	0.15	5.68
Образец 2	10	5.80	0.31	5.38
Образец 3	10	10.86	0.72	6.62

Таблица 2. Воспроизводимость внутри серии.

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC
Образец 1	16	5.84	0.27	4.70
Образец 2	16	14.92	0.55	3.68

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и плазмы крови. При изучении извлечения не обнаружено существенных отличий уровней hGH, определяемых в сыворотке, цитратной, ЭДТА и гепариновой плазме крови. Для тестирования подходят и стандартные культуральные среды. Не требуется специальной подготовки образцов перед анализом (см. ниже). Сбор образцов крови для последующей подготовки сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Охладите образцы сразу после их получения. Если образцы не будут протестированы в день сбора их можно хранить при 2-8°C в течение 2 суток и при -20°C или ниже в течение 2 лет в плотно закрытых пробирках. Хотя проведение нескольких циклов замораживания/оттаивания не оказывало влияния на результаты определения hGH, избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания (при необходимости образцы аликвотируйте).

В большинстве случаев (при тестировании сыворотки или плазмы крови, при отсутствии значительно повышенных уровней hGH) Проводить подготовку проб не нужно. Образцы тестируются неразведенными (20 мкл).

концентрация hGH в других биологических жидкостях человека, нежели сыворотка или культуральная среда, может существенно отличаться. При необходимости разводите образцы буфером для разведения VP. Для точного определения очень низких концентраций hGH рекомендуется использовать тест-систему hGH-Sensitiv ELISA E022 (чувствительность 0,0016 нг/мл или 1,6 пг/мл).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

	Реагент
MTP	96-луночный микропланшет, готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к hGH, в пакете.
CAL	Стандарты А-Е, 250 мкл, готовы содержат hGH (NIBSC 98/574). Концентрации стандартов в диапазоне 1-25 нг/мл (1, 5, 10, 15 и 25 нг/мл) рекомбинантного hGH. Используйте по 20 мкл на лунку в анализе.
BUF VP	Буфер для разведения VP, 30 мл, готов к использованию, используйте для разведения тестируемых сывороток (при необходимости).
Control	Контрольные сыворотки KS1 и KS2, по 250 мкл, готовы к использованию, содержат сыворотку крови человека. Требуемый уровень и допустимые значения hGH указаны на этикетках флаконов. Разведение контрольных сывороток необходимо проводить в соответствии с разведением тестируемых образцов. Обычно используются неразведенными, по 20 мкл на лунку в анализе.
AbCONJ	Конъюгат антител АК, 12 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные антитела к hGH. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
EnCONJ	Ферментный конъюгат ЕК, 12 мл, готов к использованию, содержит конъюгат HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
WASHBUF 20x	Буфер для промывок (WP), 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
SUBST	Субстратный раствор (S), 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
H ₂ SO ₄	Стоп-раствор (SL), 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
	Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.
- Не смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Микропланшет и все реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2–8°C. При правильном использовании компонентов набора открытие реагентов или микропланшета не влияет на их стабильность. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при 2–8°C в металлизированном пакете с осушителем.
- Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
- Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20–25°C). Если в буферах образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.
- Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20–25°C.
- Субстратный раствор - субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H₂O₂ тетраметилбензидин (ТМБ). Светочувствителен - храните и инкубируйте в темноте.
- При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, конъюгат антител АК, ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
- Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
- Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из

стных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы биологического происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Содержащие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один (проклин 950): A-E, AK, VP.

38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

Содержащие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один (Kathon CG): A-E, AK, VP, WP

38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H₂SO₄)

38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Страт TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Основные процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Все инкубации должны проводиться при комнатной температуре (20-25°C)! Интенсивность встряхивания на шейкере не должна превышать 350 rpm!

1) Внесите во все лунки по 100 мкл буфера для разведения VP.

2) Внесите в первые лунки (A1/A2) по 20 мкл стандарта A (0 нг/мл)

Внесите в лунки B1/B2 по 20 мкл стандарта B (1 нг/мл)

Внесите в лунки C1/C2 по 20 мкл стандарта C (5 нг/мл)

Внесите в лунки D1/D2 по 20 мкл стандарта D (10 нг/мл)

Внесите в лунки E1/E2 по 20 мкл стандарта E (15 нг/мл)

Внесите в лунки F1/F2 по 20 мкл стандарта F (25 нг/мл)

Для контроля точности разведения внесите в лунки G1/G2 и H1/H2 по 20 мкл неразведенных контрольных сывороток KS1 и KS2.

Внесите соответствующие лунки по 20 мкл неразведенных тестируемых образцов.

3) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

4) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по 250 мкл буфера для промывок WP на лунку на один цикл промывки. Желательно, чтобы инкубация с буфером для промывок WP длилась не менее 15 секунд на цикл.

5) Немедленно после последнего цикла промывки внесите по 100 мкл конъюгата антител АК в каждую лунку. Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 30 минут (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

6) После окончания инкубации внесите по 100 мкл ферментного конъюгата антител ЕК в каждую лунку (без промывки микропланшета) и инкубируйте в течение 30 минут (без использования шейкера).

Растворы должны быть перемешаны при добавлении. Легкое постукивание о край микропланшета способствует лучшему перемешиванию. Внимание: существует риск контаминации при увеличении объема реагентной смеси в лунках микропланшета.

7) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 4.

8) Внесите по 100 мкл раствора субстрата TMB в каждую лунку.

9) Инкубируйте в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C).

10) После окончания инкубации внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

11) Измерьте оптическую плотность при 450 нм не позднее чем через 30 минут после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,25, а значение ОП стандарта Е было выше 1,0. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации лептина может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при разведении.

построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями hGH.

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	1	5	10	15	25
мМЕ/мл	3	15	30	45	75

Рассчитайте **среднее значение ОП** дублей бланка (лунки A1/A2).

Вычтите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.

Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы **полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия** (сплайн, построение от точки к точке).

Концентрация hGH в разведенных в образцах или контрольных сыворотках KS1 и KS2 измеряется в нг/мл или мМЕ/мл, в соответствии с выбранными единицами для стандартов. При разведении тестируемых образцов полученные значения hGH умножьте на соответствующий фактор разведения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Cut-off уровень определен как максимальный пиковый уровень секреции соматотропина, по крайней мере, в двух независимых исследованиях с активацией (например, введение инсулина или аргинина). С использованием стандарта ВОЗ 98/574, аналогичного стандартному материалу, входящему в состав данной тест-системы, выявлено, что пиковый уровень секреции менее 8 нг/мл указывает на возможный дефицит соматотропина. Так как секреция соматотропина может непрерывно меняться от нормальных до патологических значений, любой cut-off уровень является только необязательной контрольной точкой. Необходимо провести дополнительные диагностические исследования для того, чтобы подтвердить результаты данного теста. В каждой лаборатории рекомендовано устанавливать свои собственные cut-off уровни для различных групп пациентов.

ПРЕДАВАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Так как гормон роста секретируется пульсаторно со стабильной устойчивой концентрацией в ночные часы, необходимо определить четкие референсные значения. Проведен стимулирующий стандартный тест при введении аргинина или инсулина (соединения, стимулирующие синтез hGH), по истечении требуемого времени были измерены уровни hGH. Была протестирована сыворотка крови 104 здоровых доноров крови в возрасте 18-69 лет без стимуляции.

Количество 54 50

Медиана [нг/мл]	0.81	0.28
Минимальная концентрация [нг/мл]	0.19	0.15
Максимальная концентрация [нг/мл]	10.15	4.34

Выбор тактики лечения никогда не должен проводиться на основании одних только лабораторных результатов, даже если все результаты анализа являются адекватными. Результат анализа - только часть всего пула клинических и лабораторных данных о клиническом состоянии пациента. Решение о тактике лечения пациента должны приниматься при тщательном анализе всех полученных данных.

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный),

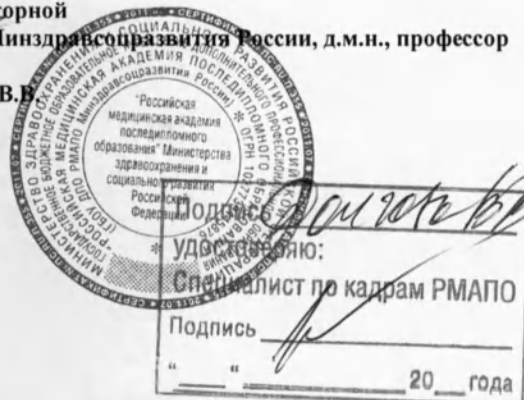
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной

диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.



Всего прошито
и пронумеровано

5 листов

Генеральный Директор
ЗАО "БиоХимМак"



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2012г.

**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения соматотропина (гормона роста человека)**

(высокочувствительный метод).

Human Growth Hormone Sensitive – ELISA.

Производитель: «Медиagnost ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

Определение соматотропина человека (hGH) используется для выявления дефицита соматотропина или его повышенной секреции (акромегалии). При проведении лекарственного или хирургического лечения акромегалии определение уровня соматотропина (вместе с IGF-I) может быть использовано для мониторинга эффективности проводимой терапии.

Тест-система Mediagnost hGH ELISA E22 позволяет точно определять концентрацию hGH в сыворотке крови (нативные образцы, образцы после проведения тестов с активацией и ингибированием роста).

Благодаря высокой чувствительности (0.0016 нг/мл или 1.6 пг/мл) данная тест-система может быть использована для измерения hGH в супернатанте клеточной культуры и других биологических образцах, кроме сыворотки (например, для оценки уровня экскреции hGH с мочой);

Данная тест-система калибрована с использованием референсной тест-системы на основе иммуноанализа (исследование KIGS/IGLU), работа проведена в Детской клинической больнице Университета города Тюбинген, Германия (см. список литературы, 1);

- Быстрое проведение анализа: общее время инкубации составляет только 3 часа 30 минут, использованы высокоаффинные многоклональные антитела к рекомбинантному hGH (22 кДа).

- Калиброван по рекомбинантному hGH (2-ой Международный стандарт, NIBSC 98/574; см. список литературы, 6)

- В состав тест-набора входят одиночные стандарты (50, 150, 300, 600 и 1000 пг/мл hGH), контрольные материалы на основе сывороток крови человека, а также микропланшет, состоящий из ломаемых стрипов.

- Используются высокоаффинные поликлональные антитела к рекомбинантному hGH (22 кДа).

- Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Эндокринная система гормона роста человека (hGH или соматотропин) является очень сложной структурой. hGH - продукт гена GH-1, расположенного в 17 хромосоме, экспрессируется клетками гипофиза. 80 % продукта экспрессии этого гена представлено негликозилированным белком, состоящим из 191 аминокислоты, с молекулярным весом 22 кДа. Остальные 20 % продуктов экспрессии гена - разные формы альтернативного сплайсинга, молекулярного веса 20 кДа. В циркуляции может быть обнаружено еще несколько других разновидностей белка, а также посттрансляционно модифицированные белки и различные белковые агрегаты. Кроме того, биологическая активность соматотропина регулируется специфическим связывающим белком (GHBP), который образуется из внеклеточной части клеточного трансмембранного рецептора к hGH. Данные модификации обуславливают жесткий контроль периода полужизни hGH и его биологической активности. GH – очень специфичное соединение.

Не только синтез, но и посттрансляционная модификация, а также и секреция hGH поддаются жесткой регуляции. Обнаружено спонтанное, пульсаторное повышение уровня синтеза hGH каждые три часа,

наиболее выраженное увеличение уровня секреции приходится на время ночного сна. Такие факторы, как физические нагрузки, стрессовые ситуации и гипогликемия приводят к активации синтеза гормона гипоталамуса соматотропин-рилизинг фактора (соматолиберина, GHRH) и увеличению секреции hGH. Возраст, половые стероидные гормоны, пищевое поведение, различные заболевания и эмоции также влияют на уровень секреции hGH. Так как существует множество факторов, влияющих на уровень синтеза hGH, нормальные, физиологические его значения не установлены.

Физиологические функции hGH также очень разнообразны. В частности, hGH влияет на функции Инсулин подобных факторов роста (IGFs). У детей и подростков система hGH является ключевым регулятором роста. При полном нарушении функции hGH системы, рост человека не превышает 120 см. Помимо регуляции роста hGH обладает анаболическим эффектом на мышечную и соединительную ткани, а также на костную ткань и ткани других органов (сердце, кишечник). Кроме того, показано, что hGH обладает липолитическим эффектом. Клиническое значение имеют как очень высокие, так и очень низкие уровни синтеза hGH. У детей дефицит Соматотропина может быть врожденным или приобретенным, что приводит к карликовости. Для диагностики дефицита соматотропина рекомендовано провести тест со стимуляцией синтеза hGH, или исследовать уровень спонтанной секреции. Лечение состоит в проведении заместительной гормональной терапии: эндогенный соматотропин замещается рекомбинантным hGH, что приводит к увеличению роста.

У взрослых дефицит hGH главным образом может развиваться при хирургическом удалении аденомы гипофиза. Дефицит hGH приводит к развитию характерных патологических изменений, аналогичных преждевременному старению (ожирение, дистрофия мышц, артериосклероз, остеопороз, астения).

Заместительная гормональная терапия является общепризнанным, одобренным и эффективным методом лечения выраженного дефицита соматотропина у взрослых. Эффективность терапии может быть непосредственно (а также косвенно) оценена по уровню инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови. Увеличение секреции hGH, главным образом, связанное с наличием аденомы гипофиза, приводит к гигантизму у детей, или формированию акромегалии (увеличению конечностей) у взрослых, а также развитию диабета, сердечной недостаточности и росту опухолей.

Хирургическое удаление аденомы является наиболее предпочтительным методом лечения. Если удаление опухоли невозможно или является неполным, то для снижения уровня синтеза hGH рекомендовано проведение лекарственной терапии препаратами соматостатина. Кроме того, в клинической практике эффективно применение препаратов, блокирующих рецепторы hGH, что сопровождается ингибированием эффектов hGH.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения соматотропина человека (hHG) высокочувствительным методом в образцах человеческой сыворотки или плазмы крови, а также в культуральной клеточной среде.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E22 определения hHG основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. hHG, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к hHG и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с hHG, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества hHG в образце.

В качестве стандартов в наборе ELISA E22 используется рекомбинантный человеческий соматотропин с концентрациями 0; 0,05; 0,15; 0,30; 0,60 и 1 нг/мл (эквивалентно 0,15, 0,45, 0,9, 1,8 и 3,0 мкМЕ/мл, см. ниже).

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E22 составляет < 0,0016 нг/мл (эквивалентно 1,6 пг/мл; 0,16 пг на лунку; 2хSD нулевого стандарта в 16 повторях).

Специфичность

Единственным белком сыворотки крови, обладающим сходными с соматотропином аминокислотными последовательностями, является пролактин. Тестирование образцов, содержащих пролактин в концентрации 200 нг/мл, с использованием данной тест-системы показало отсутствие перекрестной реактивности.

Воспроизводимость внутри серии

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC
Образец 1	16	0.45	0.02	3.65
Образец 2	22	5.94	0.13	2.16

Воспроизводимость между сериями

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC
Образец 1	10	2.39	0.14	5.98
Образец 2	14	5.37	0.21	3.93
Образец 3	11	14.33	0.45	3.12

Линейность

Определение hGH данным методом Mediagnost ELISA E22 достоверно в очень широком диапазоне возможных разведений. Линейность разведения сыворотки очень хорошая в широком диапазоне.

Разведение	Образец 1 (подсчитано, нг/мл)	Разведение	Образец 1 (подсчитано, нг/мл)
1:10	13.40	1:600	733.0
1:20	13.96	1:1200	749.8
1:40	13.50	1:2400	759.8
1:80	13.47	1:4800	756.7
1:160	13.35	1:9600	797.3
1:320	13.50		
AV / 1SD	13.53 / 0.219	AV / 1SD	759.3 / 23.6

AV = среднее значение; SD = стандартное отклонение; VC = коэффициент вариации.

Извлечение

Извлечение при использовании рекомбинантного hGH в буферном матриксе составило 100%. Извлечение hGH в различных образцах сыворотки крови и мочи человека в среднем составило 94% от ожидаемых значений.

Извлечение рекомбинантного hGH в сывороточном матриксе в сравнении с буфером.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Извлечение (%)	96.46	92.03	91.4

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
3. Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один (проклин 950): **AK, EK, VP.**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсibilизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н-изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один (Kathon CG): **AK, EK, VP, WP**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсibilизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H₂SO₄)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

R36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Субстрат TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

R20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

R36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

R36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки загрязненных поверхностей и оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

		Реагент
1)	MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к hGH, в пакете.
2)	CA L	Стандарты А-Е , лиофилизированные. Концентрации стандартов в диапазоне 0,05-1 нг/мл (50, 150, 300, 600 и 1000 пг/мл) рекомбинантного hHG (NIBSC 98/574). Стандарты (каждый) должны быть растворены в 750 мкл буфера для разведения VP .
3)	BUF VP	Буфер для разведения VP , 120 мл, готов к использованию, используйте для разведения стандартов А-Е, контролей и тестируемых сывороток .
4)		Контрольные сыворотки KS1 и KS2 , по 500 мкл, лиофилизированные, содержат

Contr ol	человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 500 мкл буфера для разведения VP. Требуемый уровень и допустимые значения hGH указаны на этикетках флаконов. Разведение контрольных сывороток необходимо проводить в соответствии с разведением тестируемых образцов.
AbCON J	Конъюгат антител АК , 12 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные антитела к hGH. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
EnCON J	Ферментный конъюгат ЕК , 12 мл, готов к использованию, содержит конъюгат HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
WASH BUF 20x	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7) SUBS T	Субстратный раствор (S) , 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
8) H ₂ SO 4	Стоп-раствор (SL) , 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)	Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед использованием все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (20-25⁰С).

Буфер для промывок

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20x буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2-8⁰С. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры.

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфер VP для разведения образцов. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования

ны) на вортке. При правильном хранении после открытия компоненты набора стабильны в течение срока годности.

микропланшет

аните стрипы при 2-8⁰С в металлизированном пакете с осушителем. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

субстрат

субстратный раствор S, стабилизированный H₂O₂ - тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и вакуируйте в темноте.

стандарты и контроли

своренные стандарты и контроли могут храниться при 2-8⁰С в течение 1 недели, 3 месяца при -20⁰С и ниже. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания (при необходимости стандарты и контроли аликвотируйте).

БОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

образцы

анным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и плазмы крови. При изучении влечения не обнаружено существенных отличий уровней hGH, определяемых в сыворотке, цитратной, ДТА и гепариновой плазме крови. Для тестирования подходят и стандартные культуральные среды. Бор образцов крови для последующей подготовки сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Охладите образцы сразу после их получения. Если образцы не будут протестированы в день сбора их можно хранить при 2-8⁰С в течение 2 суток и при -20⁰С или ниже в течение 2 лет в плотно закрытых пробирках. Хотя проведение нескольких циклов замораживания/оттаивания не оказывало влияния на результаты определения hGH, избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания (при необходимости образцы аликвотируйте).

В большинстве случаев (при тестировании сыворотки или плазмы крови, при отсутствии значительно повышенных уровней hGH) рекомендовано проводить разведение от 1:10 до 1:50 буфером для разведения VP. В соответствии с ожидаемыми значениями концентрации hGH разведение может быть большим или меньшим.

Для клинических исследований сыворотки или плазмы крови рекомендовано проводить стандартное разведение 1:26. Концентрация hGH в других биологических жидкостях или культуральной жидкости может существенно отличаться.

Предложения по проведению разведения.

Например, в пробирку типа Эппендорф с 250 мкл буфера для разведения (VP) внесите 10 мкл сыворотки или плазмы (разведение 1:26) (при проведении большой серии разведений рекомендуем использовать многоканальные пипетки). После перемешивания используйте 2x100 мкл этого разведения образцов (1:26) для анализа.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, конъюгат антител АК, ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут).

1)Внесите в первые лунки (A1/A2) по **100 мкл** буфера для разведения VP (0 нг/мл)

2)Внесите в лунки B1/B2 по **100 мкл стандарта А** (0,05 нг/мл)

Внесите в лунки C1/C2 по **100 мкл стандарта В** (0,15 нг/мл)

Внесите в лунки D1/D2 по **100 мкл стандарта С** (0,3 нг/мл)

Внесите в лунки E1/E2 по **100 мкл стандарта D** (0,6 нг/мл)

Внесите в лунки F1/F2 по **100 мкл стандарта Е** (1 нг/мл)

Для контроля точности разведения внесите в лунки G1/G2 и H1/H2 по 100 мкл разведенных (1:26, в соответствии с разведением образцов) **контрольных сывороток KS1 и KS2.**

Внесите в соответствующие лунки по 100 мкл разведенных тестируемых образцов (например, 1:26).

закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **2 часов при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по **50 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки. Желательно, чтобы инкубация с буфером для промывок WP длилась не менее 15 секунд на цикл.

Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл конъюгата антител АК** в каждую лунку.

Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **30 минут** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

После окончания инкубации внесите по **100 мкл ферментного конъюгата антител ЕК** в каждую лунку (без промывки микропланшета) и инкубируйте в течение **30 минут** (без использования шейкера).

Смеси должны быть перемешаны при добавлении. Легкое постукивание о край микропланшета способствует лучшему перемешиванию. Внимание: существует риск контаминации при увеличении объема реагентной смеси в лунках микропланшета.

После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 4.

Внесите по **100 мкл раствора субстрата ТМВ** в каждую лунку.

1) Инкубируйте в течение **15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C)**.

2) После окончания инкубации внесите по **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку.

3) Измерьте оптическую плотность при **450 нм** не позднее чем через **30 минут** после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с «хорошей лабораторной практикой» при каждом проведении анализа необходимо строить калибровочную кривую и тестировать контроли. Рекомендовано использовать национальные или международные программы оценки качества, позволяющие гарантировать точность результатов.

Желательно проанализировать достаточное количество контрольных образцов, чтобы определить средний уровень и допустимые значения, позволяющие контролировать правильность проведения анализа. Для анализа уровней в контрольных материалах используйте соответствующие статистические методы. Используйте контроли с нормальными и патологическими уровнями.

Характеристики контрольных материалов представлены в сертификате контроля качества, вложенном в набор. Уровни в контрольных материалах и допустимые значения всегда соответствуют лоту набора.

Если уровни в контрольных материалах не укладываются в допустимый диапазон, результаты анализа тестируемых образцов могут быть неточными.

В этом случае обратите внимание на следующие технические особенности проведения анализа: пипетирование, время инкубации, настройка фотометра, срок годности реактивов, хранение и условия инкубации, качество промывки.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские.

Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99

«Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве стандарта используется 2 международный стандарт hGH NIBSC 98/574, (6). При проведении в 2001 году международных исследований установлен уровень для hGH стандарта 3 мкМЕ/мл. Рекомендовано при определении уровня hGH иммуноферментным анализом калибровку проводить с использованием данного стандарта (7,8)

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,20, а значение ОП стандарта Е было выше 1,0. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации hGH может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями hGH.

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	0.05	0.15	0.30	0.60	1.0

	50	150	300	600	1000
Е/мл	0.15	0.45	0.9	1.8	3.0

Рассчитайте **среднее значение ОП** дублей бланка (лунки A1/A2).

Вычитите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.

Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы **полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия** (сплайн, построение от точки к точке).

Концентрация hGH в разведенных в образцах или контрольных сыворотках KS1 и KS2 измеряется в нг/мл, пг/мл или мкМЕ/мл, в соответствии с выбранными единицами для стандартов. Так как тестируемые образцы были разведены, полученные значения концентрации hGH умножьте на соответствующий фактор разведения.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

cut-off уровень определен как максимальный пиковый уровень секреции соматотропина, по крайней мере, в двух независимых исследованиях с активацией (например, введение инсулина или аргинина). С использованием стандарта ВОЗ 98/574, аналогичного стандартному материалу, входящему в состав данной тест-системы, выявлено, что пиковый уровень секреции менее 8 нг/мл указывает на возможный дефицит соматотропина. Так как секреция соматотропина может непрерывно меняться от нормальных до патологических значений, любой cut-off уровень является только необязательной контрольной точкой. Необходимо провести дополнительные диагностические исследования для того, чтобы подтвердить результаты данного теста. В каждой лаборатории рекомендовано устанавливать свои собственные cut-off уровни для различных групп пациентов.

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Так как гормон роста секретируется пульсаторно со стабильной устойчивой концентрацией в ночные часы, необходимо определить четкие референсные значения. Рекомендовано проведение стандартного стимулирующего теста при введении аргинина или инсулина (соединений, стимулирующих синтез hGH), с измерением уровней hGH по истечении требуемого времени. Также была протестирована сыворотка крови 104 здоровых доноров крови в возрасте 18-69 лет без стимуляции.

	Женщины	Мужчины
Количество	54	50
Медиана [нг/мл]	0.81	0.28
Минимальная концентрация [нг/мл]	0.19	0.15
Минимальная концентрация [нг/мл]	10.15	4.34

Выбор тактики лечения никогда не должен проводиться на основании одних только лабораторных результатов, даже если все результаты анализа являются адекватными. Результат анализа - только часть всего пула клинических и лабораторных данных о клиническом состоянии пациента. Решение о тактике лечения пациента должны приниматься при тщательном анализе всех полученных данных.

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный)

e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.



Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Ген. Дир. Н.Е.
"BioChemMask"



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2012г.

**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения Резистина Resistin - ELISA**
Производитель: «Медиагност ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Количественное определение резистина, как в **сыворотке**, так и в **плазме** крови.
- Очень высокая чувствительность (12 пг/мл). Возможно измерение резистина в культуральной среде, а также спинномозговой жидкости, амниотической жидкости, слюне, моче и грудном молоке.
- Быстрое проведение анализа: время инкубации составляет **4 часа**.
- Одиночные стандарты с содержанием резистина человека **20, 100, 300, 600 и 1000 пг/мл**.
- контрольные сыворотки для проведения контроля качества в соответствии с «хорошей лабораторной практикой».

Исследовано по рекомбинантному резистину.

Микропланшет разделен на стрипы.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ОПИСАНИЕ

Резистин – белок молекулярной массы 11,3 кДа, богатый цистеиновыми остатками (1). Впервые обнаружен у мышей (2), и вместе с RELM- α , RELM- β , RELM- γ входит в состав семейства резистинных молекул.

У человека обнаружены только резистин и RELM- β , но не другие члены этого семейства (1). Человеческий резистин на 53% имеет гомологичные последовательности с резистином крыс (4). Резистин имеет 11 цистеиновых остатков, синтезируется в качестве пропептида, состоящего из 108 аминокислотных остатков и секретируется в виде димера. Цистеиновые остатки связаны 2 дисульфидными мостиками (22). Помимо межмолекулярных дисульфидных мостиков имеется 5 дополнительных межмолекулярных связей (5, 6).

Наличие многомерных и олигомерных форм резистина подтверждено методом хроматографии.

Было показано, что формирование олигомеров нечувствительно к додецилсульфату натрия, но может быть ингибировано β – меркаптоэтанолом и это, вероятно, связано с образованием дисульфидных мостиков (1). Более того, возможно структура резистина зависит от его концентрации, поскольку анализ циркулярного дихроизма показал зависимое от концентрации изменение α -винтовой структуры на структуру β - полотна (1).

Синтез резистина обнаружен в белой жировой ткани (10), гипофизе (11) и клетках островков Лангерганса поджелудочной железы (12) мышей так же как в коричневой жировой ткани крыс. У человека синтез резистина обнаружен в адипоцитах, но на очень низком уровне. В условиях *in vitro* выявлена экспрессия резистина в жировой ткани, осуществляемая другими клетками, нежели адипоцитами (13). Ген резистина человека экспрессируется в клетках островков Лангерганса поджелудочной железы (12), пре-адипоцитах (14) макрофагах (15) и красном костном мозге (39). Поэтому предположили, что резистин участвует в процессах воспаления и метаболизма липидов.

Большинство исследований проведено в экспериментальной модели на мышах. Обнаружено наличие тримерных и гексамерных структур резистина в сыворотке крови (7). В отличие от адипонектина различные олигомеры резистина имеют разные биологические функции (8, 9).

В экспериментальной модели у мышей обнаружена связь уровней резистина с ожирением и резистентностью к инсулину.

У человека проведение аналогичных исследований дали неоднозначные результаты – в нескольких исследованиях обнаружена связь уровней резистина в сыворотке крови с ожирением или устойчивостью к инсулину (17, 25-31). Но другие исследования эти результаты не подтвердили (14, 16-24). Поэтому, необходимо использовать точные и воспроизводимые методы определения концентрации резистина в сыворотке крови.

Роль резистина в других физиологических процессах, нежели в энергетическом обмене была исследована с использованием нескольких разных подходов. Эксперименты с эндотелиальными клетками дали интересные результаты. Показано, что повышение концентрации резистина приводит к увеличению уровня экспрессии молекул адгезии VCAM-1 и ICAM-1 (33, 34). Таким образом, резистин, участвует в процессах воспаления эндотелия (35, 36) и, следовательно - атеросклероза. Эти данные были подтверждены результатами экспериментальных исследований у мышей. Показано, что эндотелин – 1 участвует в регуляции секреции резистина (37, 38).

В недавнем исследовании у человека показано, что резистин приводит к повышению пролиферации пре-адипоцитов и увеличению липолиза зрелых адипоцитов (38). За счет влияния на MAPK - сигнальные системы резистин оказывает важное влияние на энергетический обмен.

Результаты проведенных исследований показали, что резистин оказывает важное влияние на разнообразные физиологические процессы, однако биологическая роль резистина до конца не изучена.

Данный метод предназначен для измерения резистина человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы, а также в других биологических жидкостях, в научных целях для изучения биологических функций резистина.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения резистина человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы, а также в моче, слюне, спинномозговой жидкости, амниотической жидкости и культуральной среде, в научных целях.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E50 определения резистина основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. Резистин, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к резистину и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с резистином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества резистина в образце.

В качестве стандартов в наборе ELISA E50 используется рекомбинантный человеческий **резистин** (19,5 кДа, 2х92 аминокислоты, экспрессия в E.coli) с концентрациями **20; 100; 300; 600 и 1000 пг/мл**.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E50 составляет $< 0,012$ нг/мл (12 пг/мл; 2хSD при тестировании 15 повторов нулевого стандарта).

Специфичность

С использованием данной тест-системы были протестированы разведенные сыворотки крови (1:10) следующих видов животных: корова, кошка, курица, собака, осел, коза, морская свинка, лошадь, мышь, свинья, кролик, крыса и овца. Не было обнаружено перекрестной реакции.

Интерференция

Проведено изучение интерференции резистина с физиологически значимыми соединениями. Образцы сыворотки были обогащены соединениями, которые могут влиять на результаты анализа, и протестированы на содержание резистина. Полученные результаты сравнили с результатами определения резистина в необогащенных образцах. В таблице 1 представлены результаты сравнения. Ни одно из изученных соединений не влияло значимо на результаты определения резистина.

Таблица 1. % извлечения в сравнении с необогащенной сывороткой. Представлен % от уровня резистина в нативных, необогащенных образцах.

%	Триглицериды 100 мг/мл	Билирубин 100 мкг/мл	Гемолиз 100
---	---------------------------	-------------------------	----------------

			мкг/мл
Образец 1	101	93	94
Образец 2	115	99	99
Образец 3	104	103	147

Таблица 2. Влияние ингибиторов коагуляции. Исследовано при добавлении определенного количества ингибиторов коагуляции в буфер РР, содержащий резистин в концентрации 3 нг/мл. Представлен % уровня резистина в образцах, содержащих ингибиторы коагуляции, от уровня в образце без ингибиторов.

% резистина в буфере РР			
		Среднее (n-3)	SD
3,8 г/л	Цитрат	94	4,67
0,0068 моль/л	ЭДТА	93	4,96
30000 МЕ/л	Гепарин	96	4,89

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 6,8% и 5%, соответственно. Типичные примеры определений приведены в таблице 3 и таблице 4.

Таблица 3. Воспроизводимость внутри серии.

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC, %
Образец 1	16	5,87	0,138	2,35
Образец 2	16	12,19	0,377	3,10
Образец 3	6	14,36	0,668	4,66

Таблица 4. Воспроизводимость между сериями (по 11 определений).

	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC, %
Образец 1	2,70	0,16	5,94
Образец 2	4,20	0,28	6,77
Образец 3	5,80	0,28	4,79

Извлечение и линейность

Определение резистина данным методом Mediagnost ELISA E50 достоверно в очень широком диапазоне возможных разведений. Линейность разведения сыворотки очень хорошая в широком диапазоне (таблица 5).

Таблица 5. Извлечение и линейность при разведении образцов (две различные сыворотки).

Разведение	Образец 1 (нативный 5,5 нг/мл)	Образец 2 (нативный 2,25 нг/мл)
	+ 5 нг/мл	+ 12,25 нг/мл
	Извлечение, %	Извлечение, %

1:50	9.71	92.5	14.99	103.4
1:100	10.60	101.0	13.64	94.1
1:200	10.44	99.4	14.10	97.2
1:400	10.32	98.3	14.33	98.8

Различные биологические жидкости человека были обогащены рекомбинантным резистином человека в различных концентрациях (см. таблицу 6). В среднем % извлечения концентрации резистина составило 98% от ожидаемого уровня.

Таблица 6. Различные биологические жидкости человека были обогащены рекомбинантным резистином человека в концентрации 3 нг/мл, проведена серия разведений. Результаты определения резистина в обогащенных образцах сравнили с результатами в необогащенной сыворотке. Представлен % извлечения.

Образец	Разведение	Извлечение, %
Спинномозговая жидкость	1:2	129
Спинномозговая жидкость	1:10	93
Спинномозговая жидкость	1:40	103
Амниотическая жидкость	1:10	85
Амниотическая жидкость	1:40	91
Слюна	1:10	99
Слюна	1:21	86
Моча	1:10	79
Моча	1:21	85
Грудное молоко	1:2	97
Грудное молоко	1:10	58
Грудное молоко	1:21	63
Супернатант клеточной культуры	1:2	100

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и плазмы крови. Не обнаружено существенных отличий уровней резистина, определяемых в сыворотке, ЭДТА, гепариновой и цитратной плазме крови. При использовании гемолизированных образцов уровни резистина могут быть ложно завышенными. При интерпретации результатов определения резистина в гемолизированных образцах соблюдайте осторожность.

Данная тест-система может быть использована также для определения резистина в культуральной среде, слюне, грудном молоке и моче. Не требуется специальной дополнительной подготовки данных образцов, например, разведения с использованием специального буфера.

Сбор образцов крови для последующей подготовки сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Избегайте использования гемолизированных образцов. Образец крови необходимо инкубировать для образования сгустка и после полного его образования, отделите сыворотку центрифугированием.

Хранение образцов

Хранение при комнатной температуре: максимально 2 дня

Хранение при -20°C : максимально 2 года

Храните образцы в хорошо закрытых пластиковых пробирках.

Размораживание и оттаивание образцов более чем 3 раз недопустимо.

Подготовка образцов

Образцы необходимо растворить буфером для разведения образцов (PP). Прекрасная линейность данной тест-системы позволяет проводить разведение образцов от 1:5 до 1:400.

В большинстве случаев (при тестировании сыворотки или плазмы крови, при отсутствии значительно повышенных уровней резистина) рекомендовано проводить разведение от 1:10 до 1:50 буфером для разведения образцов PP. В соответствии с ожидаемыми значениями концентрации резистина разведение может быть большим или меньшим. Так как для точного определения концентрации резистина образцы

должны разводиться специальным буфером для разведения РР, рекомендовано минимальное разведение образцов 1:5. В различных биологических жидкостях человека концентрации резистина могут существенно отличаться (например, в сыворотке крови или супернатанте клеточной культуры).

Для клинических исследований рекомендовано проводить стандартное разведение 1:21.

Предложения по проведению разведения.

Например, в пробирку типа Эппендорф с 300 мкл буфера для разведения образцов (РР) внесите 15 мкл сыворотки или плазмы (разведение 1:21) (при проведении большой серии разведений рекомендуем использовать многоканальные пипетки). После перемешивания используйте 2х100 мкл этого разведения образцов (1:21) для анализа.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

		Реагент
1)	MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к резистину, в пакете.
2)	CA L	Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат рекомбинантный резистин. Концентрации стандартов в диапазоне 0,02-1 нг/мл (20, 100, 300, 600 и 1000 пг/мл) резистина. Стандарты (каждый) должны быть растворены в 750 мкл буфера РР для образцов . Внимание: для разведения стандартов используйте только буфер РР для образцов, так как в данном случае стандарты и тестируемые образцы инкубируются в одинаковых условиях с использованием специального буфера.
3)	DILU PP	Буфер для разведения образцов РР , 120 мл, готов к использованию, используйте для разведения стандартов А-Е, тестируемых образцов и контрольной сыворотки KS .
4)	DILU VP	Буфер для разведения VP , 25 мл, готов к использованию, используйте для разведения лиофилизированной контрольной сыворотки KS , конъюгата антител AK и ферментного конъюгата EK .
5)	Contr ol	Контрольная сыворотка , лиофилизированная, содержит человеческую сыворотку и должна быть растворена в 100 мкл буфера для разведения VP. Требуемый уровень и допустимые значения резистина указаны на этикетках флаконов. Разведение контрольной сыворотки в буфере для разведения образцов РР проводите аналогичным способом как и разведение тестируемых образцов.
6)	Ab	Конъюгат антител АК , 120 мкл, концентрат (100X), содержит биотинилированные антитела к резистину. Перед использованием разведите 1:100 буфером для разведения VP. Например, 100 мкл концентрата антител АК смешайте с 10 мл буфера для разведения VP, хорошо перемешайте. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
7)	CONJ	Ферментный конъюгат ЕК , 120 мкл, концентрат (100X), содержит пероксидазу хрена (HRP), конъюгированную со стрептавидином. Перед использованием разведите 1:100 буфером для разведения VP. Например, 100 мкл концентрата ферментного конъюгата ЕК смешайте с 10 мл буфера для разведения VP, хорошо перемешайте. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
6)	WASH BUF	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем

	20x	до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7)	SUBS T	Субстратный раствор (S), 12 мл , готов к использованию, субстрат фермента пероксидазы хрена HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
8)	H ₂ SO ₄	Стоп-раствор (SL), 12 мл , готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)		Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Не смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшет и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2–8⁰С.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20–25⁰С). Если в буферах образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием. Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20–25⁰С.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных стандартов А - Е используйте буфер для разведения образцов РР. Для растворения лиофилизированной контрольной сыворотки используйте буфер для разведения VP. Дальнейшее разведение контрольной сыворотки проводите аналогично разведению тестируемых образцов.

Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 2 месяца при –20⁰С. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛ И ФЕРМЕНТНЫЙ КОНЬЮГАТ

Используйте буфер для разведения VP для разведения концентратов (100X) конъюгата антител АК и ферментного конъюгата VP. Рабочие растворы имеют ограниченную стабильность при 2–8⁰С.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20x буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2–8⁰С. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры.

МИКРОПЛАНШЕТ

храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при $2-8^{\circ}\text{C}$, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

СУБСТРАТНЫЙ РАСТВОР

Субстратный раствор S, стабилизированный H_2O_2 - тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и инкубируйте в темноте.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики *in-vitro* и только для профессионального использования.

Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель *medagnost GmbH* не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.

Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры $20-25^{\circ}\text{C}$. При наличии преципитатов в буферах их перед использованием растворите их при перемешивании и согревании.

Не смешивайте реагенты разных серий. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Микропланшет содержит «ломаемые» стрипы в рамке – держателе. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ в металлизированном пакете.

Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта $< 0,01\%$ раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один: **A-E, AK, EK, VP.**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта $< 0,01\%$ (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один: **A-E, AK, EK, VP, WP.**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H_2SO_4)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

7. Вносите образцы и реагенты с максимально возможной скоростью, с постоянной последовательностью на разных этапах.

8. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации.

9. Используйте отдельные емкости для каждого реагента. Это особенно важно для емкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов!

10. Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения промывки.

Субстрат TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

R20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

R36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу

8.1 При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды
37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Основные процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промыть область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду и обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Залитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки загрязненных поверхностей и оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут).

Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, конъюгат антител АК, ферментный конъюгат ЕК, субстратный раствор S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

- 1) Внесите в первые лунки (A1/A2) по **100 мкл буфера для разведения образцов PP** (бланк)
- 2) Внесите в лунки B1/B2 по **100 мкл стандарта А** (0,02 нг/мл)
Внесите в лунки C1/C2 по **100 мкл стандарта В** (0,1 нг/мл)
Внесите в лунки D1/D2 по **100 мкл стандарта С** (0,3 нг/мл)
Внесите в лунки E1/E2 по **100 мкл стандарта D** (0,6 нг/мл)
Внесите в лунки F1/F2 по **100 мкл стандарта E** (1 нг/мл)
- 3) Для контроля точности разведения внесите в лунки G1/G2 по **100 мкл контрольной сыворотки KS**, разведенной 1:21 в буфере для разведения образцов PP (или аналогично разведению тестируемых образцов)
- 4) Внесите в **соответствующие лунки по 100 мкл тестируемых разведенных образцов** (например, 1:21 буфером для разведения образцов PP).
- 5) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **2 часа при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm). После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по **250 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки.
- 6) Сразу после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл конъюгата антител АК** в каждую лунку (разведенного 1:100 буфером для разведения VP). Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте **1 час при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).
- 7) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 5.
- 8) Сразу после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл ферментного конъюгата ЕК** в каждую лунку (разведенного 1:100 буфером для разведения VP). Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **30 минут при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).
- 9) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 5.

Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ в каждую лунку.

Инкубируйте в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C).

После окончания инкубации внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

Измерьте оптическую плотность при 450 нм не позднее чем через 30 минут после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

СЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,30, а значение ОП стандарта Е было выше 0,8. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации резистина может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при большем разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями резистина.

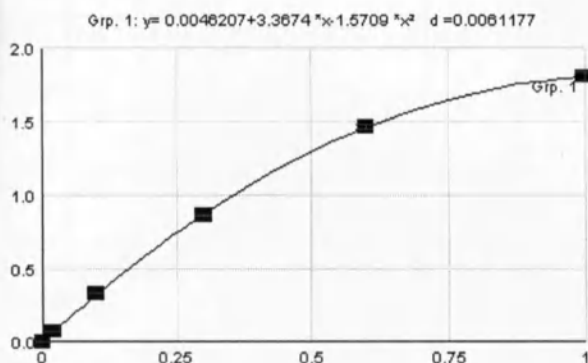
стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	0,02	0,10	0,30	0,60	1,00
мкг/мл	20	100	300	600	1000

Рассчитайте среднее значение ОП дублей бланка (лунки A1/A2).

Вычтите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.

Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна.



Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия (сплайн, построение от точки к точке).

5) Концентрация резистина в разведенных в образцах или контрольной сыворотке KS измеряется в нг/мл (или в мкг/мл в соответствии с выбранными единицами для стандартов). Концентрация резистина в неразведенных образцах вычисляется при умножении концентрации, полученной из

калибровочной кривой, на соответствующий фактор разведения.

На рисунке представлен пример построения калибровочной кривой. Не используйте для подсчета результатов при проведении анализа. Калибровочную кривую необходимо строить при каждом проведении анализа!

Пример подсчета концентрации резистина в образцах, разведенных 1:21.

ОП в тестируемом образце 0,85

ОП в бланке 0,05

Программное обеспечение позволяет автоматически вычислить концентрацию резистина в разведенном образце, используя разницу ОП в образце и бланке. Для определения концентрации резистина используйте наиболее подходящую калибровочную кривую (здесь: полиномиальную, двухуровневую).

В данном примере для вычисления концентрации резистина в образце программным обеспечением предложено следующее уравнение:

$$y = 0,0046207 + 3,3674x - 1,5709 x^2 \quad 0,2686 = x$$

так как образец разведенный (1:21), то концентрация резистина составила $0,2686 \times 21 = 5,64$ нг/мл = 0,00564 мкг/мл.

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Таблица 7. Ожидаемые нормальные значения резистина были определены при обследовании здоровых с использованием тест-системы Mediagnost E50 (анализ проведен проф. Kratzsch J., Институт лабораторной медицины, Лейпцигский университет).

Женщины				Резистин, нг/мл		
Возраст (лет)	n	Σ, лет	Σ, ИМТ	Σ ± SD	25-75 Перцентиль	Мин. – Макс.
30	96	23.0	23.1	7.2±2.6	5.4–8.8	3.1–14.7
40	63	36.5	24.3	8.1±2.3	6.4–9.6	3.6–13.1
50	67	44.9	24.8	7.3±2.5	5.7–8.1	4.0–16.1
60	29	54.7	25.0	7.2±2.6	5.4–8.5	4.0–15.5
65	9	62.7	25.2	6.6±1.1	6.0–6.7	5.4–9.3
Мужчины				Резистин, нг/мл		
Возраст (лет)	n	Σ, лет	Σ, ИМТ	Σ ± SD	25-75 Перцентиль	Мин. – Макс.
18-30	107	23.9	24.1	6.4±1,8	5.0–7.6	2.5–13.1
31-40	59	35.9	25.0	6.7±3,2	4.8–7.4	3.8–26.9
41-50	66	45.0	25.2	6.5±2,8	4.5–7.4	2.4–16.7
51-60	36	54.8	26.4	6.1±2,1	4.7–7.2	3.2–13.3
61-68	20	63.2	25.6	7.2±1,8	6.0–8.2	4.5–11.2

n = количество обследованных; Σ = среднее; ИМТ = индекс масса-тело ($\text{кг}/\text{м}^2$); SD = стандартное отклонение.

Таблица 8. Группы по ожидаемым нормальным значениям.

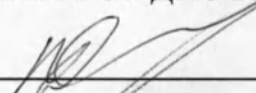
Пол	Количество	Среднее (нг/мл)	Стандартное отклонение	2,5 Перцентиль	95 Перцентиль
Мужчины	288	6.48	2.44	3.32	11.68
Женщины	264	7.41	2.47	3.68	13.60
Всего	552	6.93	2.49	3.58	13.12

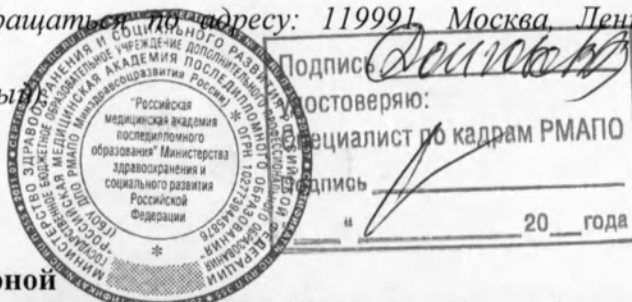
По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный)
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор

 Долгов В.В.



Всего прошито

и пронумеровано

10 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2012г.



**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения Адипонектина. Adiponectin ELISA**
Производитель: «Медиagnost ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Количественное определение адипонектина как в сыворотке, так и в плазме крови.
- Референсные значения в зависимости от пола и возраста.
- Очень высокая аналитическая чувствительность (менее чем 0,6 нг/мл)
- Быстрое проведение анализа: общее время инкубации составляет 1 час 45 минут.
- Одиночные стандарты с содержанием адипонектина человека 2, 10, 30, 70, 100 нг/мл.
- 2 контрольные сыворотки для проведения контроля качества в соответствии с «хорошей лабораторной практикой».
- Калибровка по нативному адипонектину, хорошая корреляция с результатами, полученными при использовании коммерческой радиоиммунной тест-системы.
- Используются высоко аффинные моноклональные антитела против адипонектина человека.

микропланшет разделен на стрипы.

сфера применения – клиническая лабораторная диагностика.

ОБЩЕ

Адипонектин – белок молекулярной массой 30 кДа, процентное соотношение от белков сыворотки крови составляет 0,01%, в основном циркулирует адипоцитами. Адипонектин также могут синтезировать мышечные клетки и гепатоциты. До настоящего времени, единственным известным индуктором синтеза адипонектина является IGF-I. Белок состоит из коллагеноподобного N-терминального домена и короткого C-терминального домена (1). В условиях *in vivo* адипонектин представлен различными олигомерами. Помимо тримера и димера существует мультимер с высокой молекулярной массой (1-3). До настоящего времени известно два разных рецептора, связанных с адипонектином. Оба рецептора широко представлены в разных тканях, хотя их распределение отличается. Мышечными мишенями в основном синтезируется рецептор к адипонектину 1 типа (AdipoR1), а клетками печени – рецептор 2 типа (AdipoR2) (4). Физиологическая роль адипонектина человека до конца не изучена. Результаты первых исследований показали, что уровень адипонектина отрицательно коррелирует с показателем индекса массы тела (ИМТ). Предполагают, что адипонектин участвует в регуляции энергетического обмена в клетке, например, за счет окисления жирных кислот. Помимо корреляции с показателем ИМТ, уровень адипонектина связан с инсулиновой резистентностью (5-7), а также с риском развития диабета II типа. Кроме того, адипонектин принимает участие в регуляции обмена глюкозы и жиров (8, 9). Ранее предложенные тест-системы не обладали необходимыми аналитическими характеристиками для определения адипонектина с высокой молекулярной массой, что не позволяло проводить оценку его уровня (10). Blueher и соавт., показали, что для оценки инсулиновой резистентности использование комплекса показателей: уровень потребления общей глюкозы до 40 мкмоль/кг*мин, содержание общего адипонектина, измеренное методом Mediagnost E09, с площадью 0,92 под ROC-кривой позволяет существенно увеличить их диагностическое значение (10).

Кроме того, предполагают, что адипонектин участвует в процессах воспаления (11-15) и играет важную роль в развитии атеросклероза (4, 5, 16) и воспаления коронарных сосудов (17, 18). Определение уровня адипонектина в плазме крови можно использовать в качестве диагностического теста для оценки риска развития болезни коронарных сосудов (19, 20). Помимо этого, адипонектин участвует в регуляции и других физиологических процессов, например, ангиогенеза (21, 22).

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения Адипонектина в образцах человеческой сыворотки, гепариновой или ЭДТА плазмы, в научных целях.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E09 определения адипонектина основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. Адипонектин, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к адипонектину и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с адипонектином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества адипонектина в образце.

В качестве стандартов в наборе ELISA E09 используется нативный человеческий Адипонектин с концентрациями 2; 10; 30; 70 и 100 нг/мл. Количество нативного адипонектина оценено с использованием рекомбинантного белка и коммерческой радиоиммунной тест-системы для определения адипонектина (Linco Corp.).

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E09 составляет < 0,06 нг/мл (эквивалентно < 0,06 нг на лунку; 2хSD при тестировании 16 повторов нулевого стандарта).

Специфичность

С использованием данной тест-системы были протестированы разведенные сыворотки крови (1:505) следующих видов животных: лошадь, корова, курица, кролик, собака, морская свинка, овца, мышь, коза, осел, крыса, кошка. Не было обнаружено перекрестной реакции.

Интерференция

Проведено изучение интерференции адипонектина с физиологически значимыми соединениями. Образцы сыворотки были обогащены соединениями, которые могут влиять на результаты анализа, и протестированы на содержание адипонектина. Полученные результаты сравнили с результатами определения адипонектина в необогащенных образцах. В таблице 1 представлены результаты сравнения. Ни одно из изученных соединений не влияло значимо на результаты определения адипонектина.

Таблица 1. % извлечения в сравнении с необогащенной сывороткой.

%	Триглицериды 100 мг/мл	Билирубин 100 мкг/мл	Гемолиз 100 мкг/мл
Образец 1	95	97	90
Образец 2	90	93	97
Образец 3	95	94	93

Извлечение

Извлечение при использовании рекомбинантного адипонектина в матриксе сыворотки в среднем составило 110%.

Таблица 2. % извлечения рекомбинантного адипонектина.

Адипонектин (нг/мл)	9,38	18,75	37,5	75
% извлечения	109	116	101	113

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 6,7% и 4,7%, соответственно. Типичные примеры определений приведены в таблице 3 и таблице 4.

Таблица 3. Воспроизводимость между сериями.

	Количество определений	Среднее значение (мкг/мл)	Стандартное отклонение (мкг/мл)	VC (%)
Образец 1	22	4,76	0,28	5,88
Образец 2	25	5,22	0,35	6,72
Образец 3	25	5,62	0,32	5,70
Образец 4	25	11,57	0,68	5,90

Таблица 4. Воспроизводимость внутри серии.

	Количество определений	Среднее значение (мкг/мл)	Стандартное отклонение (мкг/мл)	VC (%)
Образец 1	16	5,87	0,138	2,35
Образец 2	16	12,19	0,377	3,10
Образец 3	6	14,36	0,668	4,66

Линейность

Определение адипонектина данным методом Mediagnost ELISA E09 достоверно в очень широком диапазоне возможных разведений. Линейность разведения сыворотки очень хорошая в широком диапазоне (таблица 5).

Таблица 5. Линейность.

Разведение:	Образец 1 (пересчитанные значения, мкг/мл)	Разведение:	Образец 2 (пересчитанные значения, мкг/мл)
1:200	12,49	1:200	11,58
1:400	11,92	1:400	11,74
1:600	10,80	1:600	11,41
1:800	11,17	1:800	11,35
1:1000	12,06	1:1000	10,58
1:1200	11,64	1:1200	10,96
1:1400	10,86	1:1400	11,18
1:1600	10,75	1:1600	10,61
AV/ISD/VC%	11,46/0,66/5,8	AV/ISD/VC%	11,18/0,43/3,8

AV = среднее значение; SD = стандартное отклонение; VC = коэффициент вариации.

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и плазмы крови. Результаты при тестировании ЭДТА и цитратной плазмы ниже примерно на 18%. Данная тест-система позволяет проводить измерение содержания адипонектина в моче, грудном молоке и в культуральной среде.

Сбор образцов крови для последующей подготовки сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Образцы необходимо хранить без антикоагулянтов. Избегайте использования гемолизированных образцов. Образец крови необходимо инкубировать для образования сгустка и после полного его образования, отделите сыворотку центрифугированием.

Хранение образцов

Хранение при комнатной температуре: максимально 2 дня

Хранение при -20°C : максимально 2 года

Размораживание и оттаивание образцов более чем 5 раз недопустимо

Подготовка образцов

Образцы необходимо растворить буфером для разведения (VP). Прекрасная линейность данной тест-системы позволяет проводить разведение образцов 1:200 и 1:1600.

Для клинического применения рекомендовано проводить стандартное разведение 1:310.

Предложения по проведению разведения.

Например, в пробирку типа Эппендорф с 300 мкл буфера для разведения (VP) внесите 10 мкл сыворотки или плазмы (разведение 1:31) (при проведении большой серии разведений рекомендуем использовать многоканальные пипетки). В другую пробирку типа Эппендорф внесите 900 мкл буфера для разведения (VP) и 100 мкл тщательно перемешанного образца первого разведения. После перемешивания используйте 2x100 мкл этого разведения образцов (1:310) для анализа.

Если в наличии имеется необходимое оборудование возможно проведение одностадийного разведения образца (1:301): внесите 5 мкл образца в пробирку с 1,5 мл буфера для разведения (VP).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

	Реагент
1) MTP	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к адипонектину человека, в пакете.
2) CAL	Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат человеческий адипонектин. Концентрации стандартов в диапазоне 2-100 нг/мл (2, 10, 30, 70 и 100 нг/мл) адипонектина, стандарты (каждый) должны быть растворены в 750 мкл буфера VP для образцов. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе. Если стандарты необходимо использовать повторно, разведенные стандарты рекомендовано хранить при – 200С. Внимание: стандарты могут быть разморожены только один раз – при необходимости разделите стандарты на аликвоты.
3) BUF VP	Буфер для разведения VP , 125 мл, готов к использованию, используйте для разведения образцов, стандартов и контролей.
4) Control	Контрольные сыворотки KS1 и KS2 , по 500 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 500 мкл буфера VP для образцов. Требуемый уровень и допустимые значения адипонектина указаны на этикетках флаконов. Выполняйте разведение контрольных сывороток KS1 и KS2 в соответствии с разведением исследуемых образцов, необходимое значение концентрации должна быть получена при умножении на соответствующий фактор разведения.
5) AbCONJ	Конъюгат антител POD АК , 12 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные антитела к адипонектину и конъюгат HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
6) WASHBUF 20x	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7) SUBST	Субстратный раствор (S) , 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H2O2 тетраметилбензидин (ТМБ).
8) H2SO4	Стоп-раствор (SL) , 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)	Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Не смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшеты и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2–8°С.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20–25°С). Если в буферах образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20–25°С.

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - G и контроли KS1 & KS2) используйте буфер VP для разведения. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 2 месяца при –20°С. Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

Если планируется выполнить несколько независимых постановок одного набора в течение длительного промежутка времени, аликутируйте компоненты перед замораживанием на подходящие малые объемы.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20x буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при 2–8°С. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры.

РАСТВОР СУБСТРАТА

Раствор субстрата S, стабилизированный H2O2-тетраметилбензидин, светочувствителен – храните и инкубируйте в темноте.

МИКРОПЛАНШЕТ

Храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при 2–8°С, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
 2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
 3. Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры 20-25°C. При наличии преципитатов в буферах их перед использованием растворите их при перемешивании и согревании.
 4. Не смешивайте реагенты разных серий. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
 5. Микропланшет содержит «ломаемые» стрипы в рамке – держателе. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при 2-8°C в металлизированном пакете.
 6. Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из этих тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.
 7. Вносите образцы и реагенты с максимально возможной скоростью, с постоянной последовательностью на разных этапах.
 8. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации.
 9. Используйте отдельные емкости для каждого реагента. Это особенно важно для емкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов!
 10. Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения промывки.
- Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один: **A-E, AK, VP.**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

S45 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один: **A-E, AK, VP, WP.**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H₂SO₄)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Субстрат TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

R20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

R36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промойте область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей и оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Все инкубации должны проводиться при комнатной температуре (20-25°C). Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

Внимание: лунки A1/A2 должны оставаться пустыми до внесения раствора субстрата, шаг 7.

1) Внесите в первые лунки (A1/A2) **100 мкл** буфера для разведения VP. Внесите в соответствующие лунки по **100 мкл** стандартов, разведенной контрольной сыворотки или разведенных образцов.

2) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **1 часа при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≥ 350 rpm).

- 3) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по 250 мкл буфера для промывок WP на лунку на один цикл промывки. Желательно, чтобы инкубация с буфером для промывок WP длилась не менее 15 секунд на цикл.
- 4) Немедленно после последнего цикла промывки внесите по 100 мкл ферментного конъюгата АК в каждую лунку.
- 5) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (при возможности используйте шейкер ≥ 350 rpm).
- 6) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 3.
- 7) Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ в каждую лунку.
- 8) Инкубируйте в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C).
- 9) После окончания инкубации внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
- 10) Измерьте оптическую плотность при 450 нм не позднее чем через 30 минут после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,25, а значение ОП стандарта Е было выше 1,0. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации адипонектина может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при большем разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями адипонектина.

Стандарт	A	B	C	D	E
п/мл	2	10	30	70	100
мкг/мл	0,002	0,01	0,03	0,07	0,1

- 1) Рассчитайте среднее значение ОП дублей бланка (лунки A1/A2).
- 2) Вычтите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех других образцов, стандартов и контролей.
- 3) Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).
- 4) Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия (сплайн, построение от точки к точке).
- 5) Концентрация адипонектина в разведенных в образцах или контрольных сыворотках KS1 и KS2, в нг/мл (или мкг/мл, в зависимости от единиц, выбранных для стандартов), может быть определена как произведение значения, полученного из калибровочной кривой, на соответствующий коэффициент разведения.

На рисунке представлен пример построения калибровочной кривой. Не используйте для подсчета результатов при проведении анализа. Калибровочную кривую необходимо строить при каждом проведении анализа!

Пример подсчета концентрации адипонектина в образцах, разведенных 1:310.

ОП в тестируемом образце 0,39

ОП в бланке 0,04

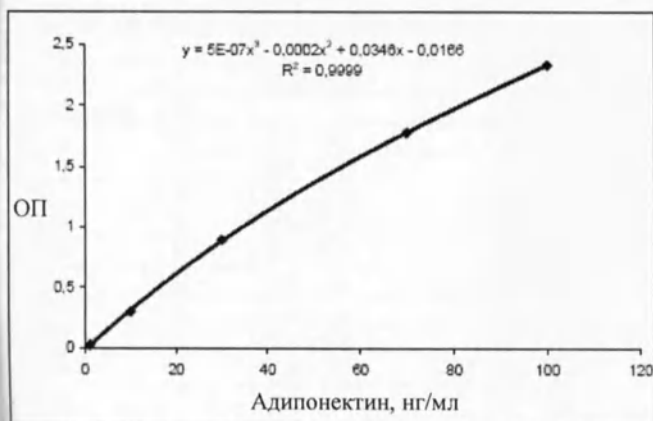
Программное обеспечение позволяет автоматически вычислить концентрацию адипонектина в разведенном образце, используя разницу ОП в образце и бланке. Для определения концентрации адипонектина используйте наиболее подходящую калибровочную кривую (здесь: полиномиальную, трехчленную).

В данном примере для вычисления концентрации адипонектина в образце программным обеспечением предложено следующее уравнение:

$$0,35 = 5 \times 10^{-7} x^3 - 0,0002x^2 + 0,0346x - 0,0166$$

$$11,13 = x$$

Если принять в расчет фактор разведения (1:310), то концентрация адипонектина в неразведенном образце составила: $11,13 \times 310 = 3450,3$ нг/мл = 3,45 мкг/мл.



ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные значения для концентраций адипонектина в сыворотке крови, определенные у практически здоровых лиц с использованием ИФА набора Mediagnost ELISA E09 (исследование проведено под руководством проф. J. Kratzsch в отделении лабораторной медицины, университетского госпиталя, г. Лейпциг) представлены в таблице 6. Была проведена статистическая обработка результатов для интерпретации индивидуальных результатов.

Результаты исследования показали достоверную корреляцию уровня адипонектина в сыворотке крови с возрастом и полом обследуемых. Напротив, связь содержания адипонектина с ИМТ менее значима. Содержание адипонектина в образцах пуповинной крови новорожденных очень высокое.

Таблица 6а: Ожидаемые значения в образцах сывороток здоровых взрослых людей (среднее значение, медиана, 5 и 95 перцентили).

Количество образцов	Среднее значение	Медиана (мкг/мл)	Стандартное отклонение	5 перцентиль (мкг/мл)	95 перцентиль
---------------------	------------------	------------------	------------------------	-----------------------	---------------

		(мкг/мл)		(мкг/мл)		(мкг/мл)
Женщины	101	102	9.1	4.6	4.0	194
Мужчины	125	68	6.1	4.1	2.0	139
Всего	226	83	7.5	4.6	2.4	193

Таблица 66: Ожидаемые значения в образцах сывороток здоровых детей (среднее значение, медиана, 5 и 95 перцентили).

Возраст (лет)	Кол-во образцов	Среднее значение (мкг/мл)	Медиана (мкг/мл)	Стандартное отклонение (мкг/мл)	5 перцентиль (мкг/мл)	95 перцентиль (мкг/мл)
0-3.99	131	8.71	8.18	4.32	3.05	15.6
4-13.99	134	8.97	8.12	5.13	3.36	18.6
Всего	265	8.84	8.18	4.74	3.33	16.5

Таблица 66: Ожидаемые значения в образцах сывороток в зависимости от возраста обследуемых (среднее значение, медиана, 5 и 95 перцентили).

Возраст (лет)	Кол-во образцов	Среднее значение (мкг/мл)	Медиана (мкг/мл)	5 перцентиль (мкг/мл)	95 перцентиль (мкг/мл)
0-7.99	46	12.82	11.7	2.33	26.5
8-9.99	40	8	8.09	3.96	14.9
10-11.99	55	8.02	7.14	3.36	13.8
12-13.99	26	8.21	7.54	4.5	13.2
14-15.99	59	8.12	8.09	3.67	13.7
16-19.99	41	7.97	7.79	2.74	13.3
Всего	267	8.88	8.18	3.33	16.7
20-29.99	47	6.72	6.38	2.5	12.25
30-39.99	38	7.38	6.69	1.98	19.29
40-49.99	55	8.42	8.20	2.41	17.85
50-59.99	47	9.61	8.55	2.15	19.85
60	32	9.52	8.57	3.00	21.10
Всего	226	8.33	7.5	2.41	19.29

Таблица 66: Ожидаемые значения в образцах сывороток в зависимости от возраста, пола и ИМТ обследуемых (среднее значение, медиана, 5 и 95 перцентили).

Женщины			Адионектин (мкг/мл)			
Возраст (лет)	n	ИМТ: M±SD	M±SD	Медиана	Перцентиль 25-75	Мин-Макс.
Пуповинная кровь	19		2980±12.49	26.1	19.5-35.2	16.9-61.4
<3.99	9	15.73±0.79	14.43±7.76	11.2	8.2-21.8	2.3-26.7
4.0-7.99	11	16.01±1.94	8.46±4.73	9.3	2.9-12.1	1.4-15.6
8.0-9.99	22	17.58±3.84	7.92±3.00	8.2	5.2-10.0	3.6-15.1
10.0-11.99	33	17.83±1.86	7.66±4.59	6.6	5.0-8.8	3.1-20.9
12.0-13.99	11	19.85±2.31	8.22±5.64	7.5	6.5-9.2	4.9-13.2
14.0-15.99	27	19.91±1.72	8.83±9.25	8.9	5.2-11.8	2.6-17.7
16.0-19.99	18	21.64±2.64	9.00±3.22	8.7	6.9-11.2	2.7-14.0
20.0-29.99	24	23.12±5.01	7.39±3.35	7.3	5.7-9.0	3.4-17.8
30.0-39.99	17	23.20±2.86	9.19±3.89	8.6	7.2-10.4	3.6-19.3
40.0-49.99	26	24.50±4.11	9.93±3.59	9.5	7.5-11.6	4.4-19.6
50.0-59.99	21	24.61±3.31	11.5±5.49	10.0	8.0-15.9	2.0-23.1
≥60.0	8	24.63±1.89	15.6±4.64	15.3	11.4-18.2	11.2-24.1

n = количество обследуемых; M±SD = среднее значение ± стандартное отклонение; ИМТ = индекс масса – тело (кг/м²)

Мужчины			Адионектин (мкг/мл)			
Возраст (лет)	n	ИМТ: M±SD	M±SD	Медиана	Перцентиль 25-75	Мин-Макс.
Пуповинная кровь	10		2780±7.68	26.7	22.2-31.0	15.6-40.6
<3.99	14	16.17±1.81	16.57±6.55	14.3	11.6-21.2	5.8-40.3
4.0-7.99	12	15.69±1.05	11.24±5.43	9.7	8.9-15.9	3.5-18.6
8.0-9.99	18	16.45±1.76	8.11±2.93	7.6	6.2-9.1	5.0-15.4
10.0-11.99	21	18.34±2.18	8.43±3.91	7.8	5.2-10.9	3.4-20.2
12.0-13.99	14	18.61±2.11	7.59±2.86	7.1	6.0-10.3	2.4-12.2
14.0-15.99	32	19.86±2.00	7.53±2.52	7.4	5.1-9.3	3.8-15.4
16.0-19.99	23	22.03±2.42	7.16±3.53	6.9	4.2-9.6	2.0-13.9
20.0-29.99	23	23.43±2.48	5.44±2.29	5.8	4.0-6.9	1.3-10.3
30.0-39.99	21	23.33±2.72	5.92±4.60	4.4	2.7-6.7	1.9-20.6
40.0-49.99	22	23.79±2.41	6.13±2.92	5.5	3.8-8.3	2.1-11.6
50.0-59.99	23	26.68±2.77	7.45±4.50	6.7	5.0-8.8	1.4-19.6
≥60.0	24	25.72±2.12	7.48±3.92	7.6	4.6-9.2	3.0-21.1

n = количество обследуемых; M±SD = среднее значение ± стандартное отклонение; ИМТ = индекс масса – тело (кг/м²)

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ГБОУ ДПО РМАПО «БиоХимМак»
Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный),
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Директор кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU



Подпись: *[Signature]*
Специалист по кадрам РМАПО
20__ года

Всего прошито

и пронумеровано

6 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

2012г.

**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения Лептина (Leptin – ELISA)
Производитель: «Медиagnost ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).**

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

Количественное определение лептина как в сыворотке, так и в плазме крови.

Согласовано по международным стандартам ВОЗ: NIBSC код 97/594.

Контрольные стандарты с содержанием лептина человека 1, 10, 25, 50 и 100 нг/мл.

Скорее проведение анализа: время инкубации составляет 1 час 75 минут.

Контрольные сыворотки для проведения контроля качества в соответствии с «хорошей лабораторной практикой».

Специальный к использованию конъюгат антител, не требуется подготовки образцов

Микропланшет разделен на стрипы.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Лептин – продукт гена ob (1, 2), недавно открытый одноцепочечный протеогормон с молекулярной массой 16 кДа. Предполагают, что он играет ключевую роль в регуляции массы тела и последовательность его аминокислот практически не имеет гомологичных последовательностей с другими белками (1). Лептин синтезируется почти исключительно дифференцированными адипоцитами (3-5). Лептин обладает влиянием на центральную нервную систему, в частности на гипоталамус, что приводит к снижению потребления пищи и увеличению расходования энергии (2, 6-9). Рецептор лептина – продукт альтернативного сплайсинга разной длины, принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов I типа (10 - 12). Лептин в организме человека распространен повсеместно (10, 11, 13, 14), что позволяет предположить его участие во многих физиологических процессах, но функции лептина до конца не изучены. Циркулирующая форма рецептора лептина – один из лептин связывающих белков (15). Помимо метаболических эффектов лептин имеет выраженное влияние на ряд эндокринных механизмов. У самцов мышей лептин уменьшает индуцируемое голоданием снижение уровней лютеинизирующего гормона, тестостерона, тироксина и увеличение АКТГ и кортикостерона. У самок мышей лептин предупреждает индуцируемую голоданием задержку овуляции (16). Мыши ob/ob с генетическим дефектом лептина бесплодны. Этот дефект можно скорректировать при введении лептина, но не за счет снижения массы тела при голодании (17). Это доказывает, что лептин является одним из основных регуляторов репродуктивных функций.

Все эти эффекты, как минимум частично, можно объяснить супрессивным эффектом лептина на экспрессию и секрецию нейротропного фактора Y (NPY) нейронами в дугообразном ядре гипоталамуса (6, 18, 19). Как известно, NPY является сильным стимулятором аппетита (20, 21) и участвует в регуляции синтеза различных гормонов гипофиза, например, снижает уровень соматотропного гормона роста за счет стимуляции соматостатина (22, 23), снижения уровня гонадотропина (23) или стимуляции гипофизарно – адреналовой системы (21).

Наиболее сильным регулятором уровня лептина является количество жировой ткани тела (24-26). Очевидно, при регулярном приеме пищи, уровень лептина отражает долю жировой ткани (27), обнаружена экспоненциальная связь (37). Этот конституционно опосредованный синтез лептина

регулируется рядом негормональных и гормональных факторов. Стимуляторами синтеза лептина как у грызунов, так и у человека является перекармливание (28,29), инсулин (3,5,30-33) и глюкокортикоиды (5, 34-36). Снижение синтеза лептина обнаружено при голодании (27), использовании циклического аденозинмонофосфата и агонистов β -3-адренорецепторов (35). Из приведенных выше данных становится очевидным, что лептин является составляющей частью различных метаболических и эндокринных механизмов (т.н. «обратных связей») (38). Для клинического использования важно отметить, что уровень лептина в сыворотке крови подвержен умеренным циркадным изменениям, пик содержания лептина приходится примерно на два часа ночи (37). Уровень лептина в это время на 30 - 100 % выше, чем уровень в утренние часы или рано днем. Так как существуют циркадные изменения, и влияние приема пищи на уровень лептина необходимо учитывать условия сбора образцов крови. При стандартизации условий сбора крови - регулярном приеме пищи и сборе крови в утренние часы или рано днем, измерение уровня лептина является высоко информативным.

Для адекватной интерпретации измеренных уровней лептина необходимо использовать референсные значения. Поскольку масса жировой ткани является главным фактором, влияющим на уровень лептина, измеренные значения должны быть соотнесены с долей жировой ткани, оцененной по индексу массы тела (ИМТ) или с использованием метода биоэлектрического сопротивления. Уровни лептина у женщин выше, чем у мужчин (38,39), у детей и подростков уровень лептина зависит также от полового развития и возраста (40). Поэтому, референсные значения лептина должны быть стратифицированы по полу и половому развитию.

Уровни лептина у наиболее тучных пациентов высокие, что позволяет предположить отсутствие чувствительности к лептину (20,26,37,38,41,42). У небольшого количества пациентов, несмотря на выраженное ожирение, уровни лептина были чрезвычайно низкими. Необходимо проведение дальнейших исследований этого нового патофизиологического состояния – дефицит лептина. Так как лептин играет важную роль в реализации репродуктивных функций, изучение связи сниженных уровней лептина с бесплодием позволит выявить новые патофизиологические механизмы развития данного заболевания.

Открытие лептина стимулировало проведение огромного количества научных исследований, посвященных изучению регуляции синтеза и эффектов этого нового гормона. Что наиболее важно, эти исследования позволили лучше понять физиологические механизмы регуляции массы тела и представить возможные патофизиологические механизмы развития ожирения и расстройств пищевого поведения. Кроме того, предложены возможные патофизиологические механизмы развития некоторых видов бесплодия.

Данный метод предназначен для измерения лептина человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы, а также в культуральной среде адипоцитов в научных и диагностических целях.

С использованием данной тест-системы возможно проведение анализа у кахексичных и анорексичных пациентов, маленьких детей, а также в таких биологических средах как моча, слюна, спинномозговая жидкость.

Сравнение измеренных уровней лептина к референсным значениям в соответствии с ИМТ позволит определить возможную причину ожирения у конкретного пациента: дефицит лептина или резистентность к нему.

Из-за высокой корреляции лептина с массой жировой ткани измерение его при стандартизованных условиях можно использовать в качестве простого и недорогого теста для оценки массы жировой ткани.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный метод предназначен для измерения лептина человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы, а также в моче, слюне, спинномозговой жидкости и культуральной среде адипоцитов, в научных и диагностических целях.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА И ВАЛИДАЦИЯ

Данный метод Mediagnost ELISA E07 определения лептина основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. Лептин, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к лептину и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с лептином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества лептина в образце.

В качестве стандартов в наборе ELISA E07 используется нативный человеческий лептин с концентрациями **1; 10; 25; 50 и 100 нг/мл. Чувствительность**

Аналитическая чувствительность метода ELISA E07 составляет $< 0,2$ нг/мл ($2 \times SD$ нулевого стандарта).

Специфичность

При использовании данной тест-системы были обнаружены слабые перекрестные реакции с лептином мыши, крысы, овцы и курицы. Не было обнаружено перекрестной реакции с другими белками, такими как инсулин или инсулиноподобный фактор роста-1.

Интерференция

Проведено изучение интерференции лептина с физиологически значимыми соединениями. Образцы сыворотки были обогащены соединениями, которые могут влиять на результаты анализа, и протестированы на содержание лептина. Полученные результаты сравнили с результатами определения лептина в необогащенных образцах. В таблице 1 представлены результаты сравнения. Ни одно из изученных соединений не влияло значимо на результаты определения лептина.

Таблица 1. % извлечения в сравнении с необогащенной сывороткой.

%	Триглицериды 100 мг/мл	Билирубин 100 мкг/мл	Гемолиз 100 мкг/мл
Образец 1	95	101	94
Образец 2	107	105	105
Образец 3	111	101	101

Извлечение

Извлечение при использовании стандартов Национального института биологических стандартов и контролей (NIBS) в среднем составило 108,3 %.

Таблица 2. % извлечение рекомбинантного лептина.

Лептин NIBS (нг/мл)	10,5	22,5	42,4
% извлечения	106	113	106

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 10%. Типичные примеры определений приведены в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2. Воспроизводимость внутри серии.

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)
Образец 1	15	4,97	0,27
Образец 2	15	37,11	2,55

Таблица 3. Воспроизводимость между сериями.

	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC
Образец 1	3,95	0,32	8,3
Образец 2	6,51	0,44	6,8
Образец 3	33,16	2,56	7,7

Линейность

Определение лептина данным методом Mediagnost ELISA E07 достоверно в очень широком диапазоне возможных разведений. Линейность разведения сыворотки очень хорошая в широком диапазоне (таблица 4).

Таблица 4. Линейность.

Разведение:	Образец 1 (нг/мл)	Разведение:	Образец 2 (нг/мл)
1:1	35,2	1:1	17,8
1:2	35,0	1:2	17,3
1:5	38,6	1:5	18,0
1:10	35,5	1:10	17,7
1:20	40,6	1:20	15,9
AV/1SD/VC%	36,96/2,5/6,8	AV/1SD/VC%	17,4/0,86/4,97

AV = среднее значение; SD = стандартное отклонение; VC = коэффициент вариации.

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и плазмы крови, а также мочи, слюны, спинномозговой жидкости и культуральной среды.

Сбор образцов крови для последующей подготовки сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Избегайте использования гемолизированных образцов. Образец крови необходимо инкубировать для образования сгустка и после полного его образования, отделите сыворотку центрифугированием.

При нормальном режиме питания обследуемого взятие крови необходимо проводить утром или рано днем, так как существуют циркадные изменения уровня лептина с максимальным его значением к двум часам ночи.

Хранение образцов

Хранение при комнатной температуре: максимально 2 дня

Хранение при -20°C : максимально 2 года

Размораживание и оттаивание образцов более чем 3 раз недопустимо.

Подготовка образцов

Проводить подготовку проб не нужно. Образцы тестируются неразведенными (20 мкл).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

		Реагент
1)	MT P	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к лептину, в пакете.
2)	CA L	Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат рекомбинантный лептин. Стандарты (каждый) должны быть растворены в 750 мкл буфера VP для образцов . Растворенные стандарты могут храниться при -20°C . Перед использованием замороженных стандартов их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа. Концентрации стандартов в диапазоне 1-100 нг/мл (1, 10, 25, 50 и 100 нг/мл) рекомбинантного лептина человека.
3)	BUF VP	Буфер для разведения VP , 25 мл, готов к использованию, используйте для разведения стандартов и контрольных сывороток KS1 и KS2 .
4)	Contr ol	Контрольные сыворотки KS1 и KS2 , по 500 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 500 мкл буфера VP для образцов. Требуемый уровень и допустимые значения лептина указаны на этикетках флаконов. Растворенные контрольные сыворотки могут храниться при -20°C . Перед

		использованием замороженных контрольных сывороток их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа.
5)	AbCON J	Конъюгат антител POD АК , 12 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные антитела к лептину и конъюгат HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
6)	WASH BUF 20x	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7)	SUBS T	Субстратный раствор (S) , 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H ₂ O ₂ тетраметилбензидин (ТМБ).
8)	H ₂ SO 4	Стоп-раствор (SL) , 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)		Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Не смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшет и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре 2–8°C.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20-25°C). Если в буферах образовались преципитаты, то их необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при 20-25°C.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфер VP для разведения. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 2 месяца при -20°C . Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20х буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при $2-8^{\circ}\text{C}$. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры.

МИКРОПЛАНШЕТ

Храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при $2-8^{\circ}\text{C}$, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.
 2. Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.
 3. Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры $20-25^{\circ}\text{C}$. При наличии преципитатов в буферах их перед использованием растворите их при перемешивании и согревании.
 4. Не смешивайте реагенты разных серий. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
 5. Микропланшет содержит «ломаемые» стрипы в рамке – держателе. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ в металлизированном пакете.
 6. Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антителам к вирусу гепатита С (HCV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.
- Следующие компоненты содержат в качестве консерванта $< 0,01\%$ раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один: **AK, VP.**

R34 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

S45 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу

Следующие компоненты содержат в качестве консерванта $< 0,01\%$ (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один: **AK, VP, WP.**

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

R43 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

Стоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H_2SO_4)

R36/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

7. Вносите образцы и реагенты с максимально возможной скоростью, с постоянной последовательностью на разных этапах.

8. Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации.

9. Используйте отдельные емкости для каждого реагента. Это особенно важно для емкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов!

10. Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения промывки.

Субстрат ТМВ (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

R20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

R36/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

S26 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

S28.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

S36/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Общие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промойте область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обуви.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей и оборудования используйте соответствующий детергент.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ЗАМЕЧАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). **Все инкубации должны проводиться при комнатной температуре (20-25°C)! Интенсивность встряхивания на шейкере не должна превышать 350 rpm!**

Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, ферментный конъюгат ЕК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

Внимание: лунки A1/A2 должны оставаться пустыми до внесения раствора субстрата, шаг 7.

1) Внесите во все лунки по **100 мкл буфера для разведения VP**.

2) Внесите в первые лунки (A1/A2) по **20 мкл буфера для разведения VP** (бланк) и по **20 мкл** стандартов, контрольной сыворотки или разведенных образцов в соответствующие лунки.

3) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **1 часа при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

4) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по **300 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки. Желательно, чтобы инкубация с буфером для промывок WP длилась не менее 15 секунд на цикл.

5) Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл ферментного конъюгата АК** в каждую лунку. Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **30 минут** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).

6) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 4.

7) Внесите по **100 мкл раствора субстрата ТМВ** в каждую лунку.

8) Инкубируйте в течение **15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C)**.

9) После окончания инкубации внесите по **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку.

10) Измерьте оптическую плотность при 450 нм не позднее чем через 30 минут после внесения раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

Протокол анализа без использования шейкера

Если нет в наличии шейкера, смешивание образцов с буфером для разведения VP может быть неоптимальным. В этом случае проведите разведение тестируемых образцов (1:6) вне микропланшета. Для анализа используйте по 120 мкл разведенных таким образом образцов. Последующую инкубацию проводите при комнатной температуре (20-25°C) без встряхивания на шейкере. Инкубацию с раствором субстрата TMB проводите в течение 30 минут в темноте вместо 15 минут.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,25, а значение ОП стандарта Е было выше 1,0. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации лептина может дать неточные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями лептина.

Стандарт	A	B	C	D	E
нг/мл	1	10	25	50	100

- 1) Рассчитайте среднее значение ОП дублей бланка (лунки A1/A2).
- 2) Вычтите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.
- 3) Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).
- 4) Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия (сплайн, построение от точки к точке).
- 5) Концентрация лептина в разведенных в образцах или контрольных сыворотках KS1 и KS2 измеряется в нг/мл.

На рисунке представлен пример построения калибровочной кривой. Не используйте для подсчета результатов при проведении анализа. Калибровочную кривую необходимо строить при каждом проведении анализа!

Пример подсчета концентрации лептина в неразведенных образцах.

ОП в тестируемом образце 0,39

ОП в бланке 0,04

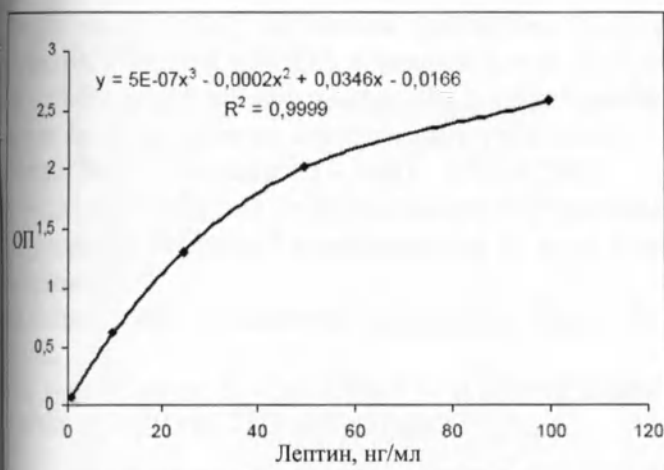
Программное обеспечение позволяет автоматически вычислить концентрацию лептина в разведенном образце, используя разницу ОП в образце и бланке. Для определения концентрации лептина используйте наиболее подходящую калибровочную кривую (здесь: полиномиальную, трехуровневую).

В данном примере для вычисления концентрации лептина в образце программным обеспечением предложено следующее уравнение:

$$0,35 = 5 \times 10^{-7} x^3 - 0,0002x^2 + 0,0346x - 0,0166$$

$$7,012 = x$$

Так как образец неразведенный, то концентрация лептина составила 7,012 нг/мл.



ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень лептина в основном определяет количество жировой ткани. У худых лиц уровень лептина низкий, у страдающих ожирением пациентов - высокий. Кроме того, существуют четкие гендерные различия, у женщин уровень лептина выше, чем у мужчин. Также уровень лептина зависит от полового развития. Поэтому всегда при определении референсных значений нужно учитывать влияние этих факторов.

Существует несколько методов оценки доли жировой ткани в организме, такие как подсчет индекса массы тела (ИМТ) (вес (кг) разделенный на квадрат роста (м)), оценка биоэлектрического сопротивления и результатов двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии тела. Хотя точность ИМТ для оценки реального количества жировой ткани гораздо ниже, чем двух других современных методов, но ИМТ имеет следующие преимущества:

- 1) не зависит от применения регрессионных моделей
- 2) просто определить, необходимы только данные о массе тела и росте
- 3) в большинстве случаев эти данные можно оценить ретроспективно
- 4) более точная оценка при быстром изменении массы жировой ткани, например, при голодании.

Поэтому ожидаемые значения соотнесены с ИМТ, как наиболее сильным независимым регулятором уровня лептина, а также с полом и степенью полового развития (45; см. рисунки 2-9 и таблицы 6-13). Среди обследуемых старше 20 лет не выявлено значительных влияний возраста на уровень лептина. Эти референсные значения, соотнесенные с полом и половым развитием, можно использовать для сравнения измеренного уровня лептина с ИМТ у здоровых лиц и выявления патологических изменений. Наиболее подходящей для различных подгрупп является экспоненциальная регрессионная прямая следующего вида:

$$\text{Лептин} = a * e^{(b * \text{ИМТ})}$$

Для подсчета 5 и 95 перцентилей используются следующие уравнения:

$$\text{Лептин} = a * e^{(b * \text{ИМТ} - c)} \text{ и}$$

$$\text{Лептин} = a * e^{(b * \text{ИМТ} + c)}, \text{ соответственно.}$$

На полулогарифмической шкале (ось Y = log лептин), это уравнение дает прямую линию. В таблице 5 представлены коэффициенты a, b, c в соответствии с полом и степенью полового развития у детей и подростков, а также у взрослых. С использованием этих коэффициентов легко определить референсные значения лептина для низких и высоких значений ИМТ.

Пример:

50 перцентиль лептина для мальчиков со степенью полового развития 3 и 4 определен по следующему уравнению:

$$\text{Лептин} = 0,0181 * e^{(0,2067 * \text{ИМТ})}$$

$$5 \text{ перцентиль составил: } \text{Лептин} = 0,0181 * e^{(0,2067 * \text{ИМТ} - 1,1919)}$$

$$95 \text{ перцентиль составил: } \text{Лептин} = 0,0181 * e^{(0,2067 * \text{ИМТ} + 1,1919)}$$

На полулогарифмическом графике эти прямые параллельны и находятся на одинаковом расстоянии от прямой 50 перцентилея.

Оценка девиации от стандартного отклонения

Удобный метод для обнаружения отклонения измеренной концентрации лептина от соответствующего референсного уровня - это подсчет стандартного отклонения, с учетом ИМТ, пола и полового развития, и выражается девиацией от стандартного отклонения (SDS). Этот метод можно рассматривать как нормализацию по референсным значениям у здоровых лиц. Таким образом, уровни лептина могут быть

соотнесены с ИМТ, половым развитием и возрастом (то есть, исключено влияние пола, полового развития, возраста и ИМТ), а данные могут быть объединены для дальнейшего анализа.

В соответствии с логарифмическим распределением уровней лептина, девиация стандартных отклонений может быть оценена по следующему уравнению:

$$\text{Лептин SDS} = (\ln(\text{лептин}) - \ln(a) - b \cdot \text{ИМТ}) / d$$

Исходя из уравнения $\ln$ представлен натуральным логарифмом (по основанию e). Константы a , b и d получены из таблицы 5 в зависимости от пола и степени полового созревания/возраста.

Например:

Мальчики степень полового развития по Tanner 3, ИМТ = 25 кг/м², измеренная концентрация лептина = 5 мкг/мл.

$$\text{SDS лептин} = (\ln(5) - \ln(0,0181) - 0,2067 \cdot 25) / 0,6850 = 1,6094 - (-4,0118) - 5,1675 / 0,6850 = 0,66$$

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 5. Константы a , b , c , d для подсчета референсных значений лептина и стандартного отклонения на основании ИМТ (см. раздел Ожидаемые нормальные значения).

Группа здоровых лиц стратифицирована по полу, половому развитию/возрасту.

группа обследуемых	количество	a	b	c	d
Мужчины					
TS 1 и 2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3 и 4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Взрослые	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Женщины					
TS 1 и 2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3 и 4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Взрослые	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

TS – степень полового созревания по Tanner

– количество обследуемых

a , b , c , d – константы (см. текст)

Таблица 6. Девочки TS 1 и TS 2.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
1	0.22	0.30	0.66	1.45	1.99
2	0.28	0.39	0.85	1.86	2.56
3	0.36	0.50	1.09	2.38	3.29
4	0.46	0.64	1.40	3.06	4.22
5	0.60	0.82	1.79	3.93	5.42
6	0.76	1.05	2.30	5.04	6.96
7	0.98	1.35	2.95	6.47	8.93
8	1.25	1.73	3.79	8.31	11.5
9	1.61	2.22	4.87	10.7	14.7
10	2.07	2.85	6.25	13.7	18.9
11	2.65	3.66	8.03	17.6	24.3
12	3.41	4.70	10.3	22.6	31.2
13	4.37	6.03	13.2	29.0	40.0
14	5.62	7.75	17.0	37.2	51.4
15	7.21	9.95	21.8	47.8	65.9
16	9.26	12.8	28.0	61.4	84.7
17	11.9	16.4	35.9	78.8	109.0
18	15.3	21.1	46.1	101.0	140.0
19	19.6	27.0	59.2	130.0	
20	15.2	34.7	76.1		
21	32.3	44.6	97.7		
22	41.5	57.2	125.		
23	53.2	73.4	0		
24	68.4	94.3			
25	87.8	121.			
26	113	0			
27	145				

Девочки TS 1 и 2

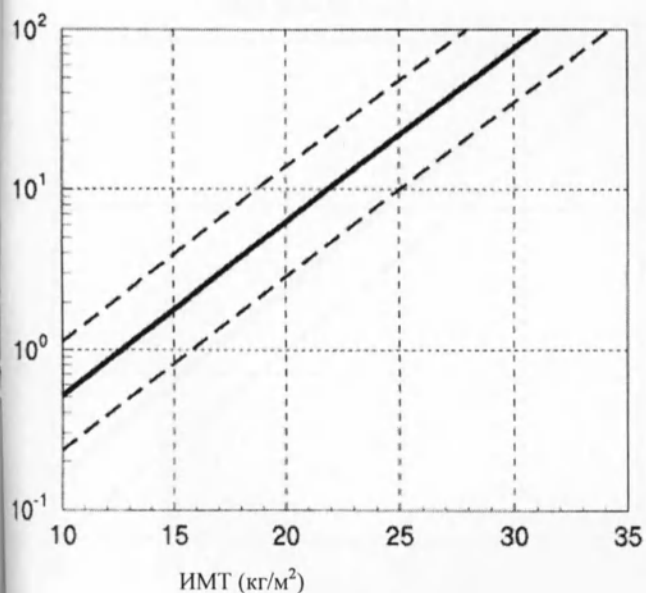


Рисунок 2. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Девочки TS 1 и TS2 (см. текст).

Таблица 7. Мальчики TS 1 и TS 2.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
11	0.08	0.12	0.29	0.69	0.99
12	0.01	0.16	0.38	0.91	1.30
13	0.14	0.20	0.49	1.19	1.71
14	0.19	0.26	0.65	1.56	2.24
15	0.24	0.35	0.85	2.04	2.93
16	0.32	0.46	1.11	2.68	3.84
17	0.41	0.60	1.45	3.51	5.04
18	0.55	0.79	1.90	4.60	6.60
19	0.72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0.94	1.35	3.27	7.90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3.99	9.66	23.3	33.5
25	3.65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7.78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98.8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129.0
30	14.1	20.3	48.9	118.0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110.0		
34	41.7	59.8	144.0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102.0			
37	93.9	134.0			
38	123.0				

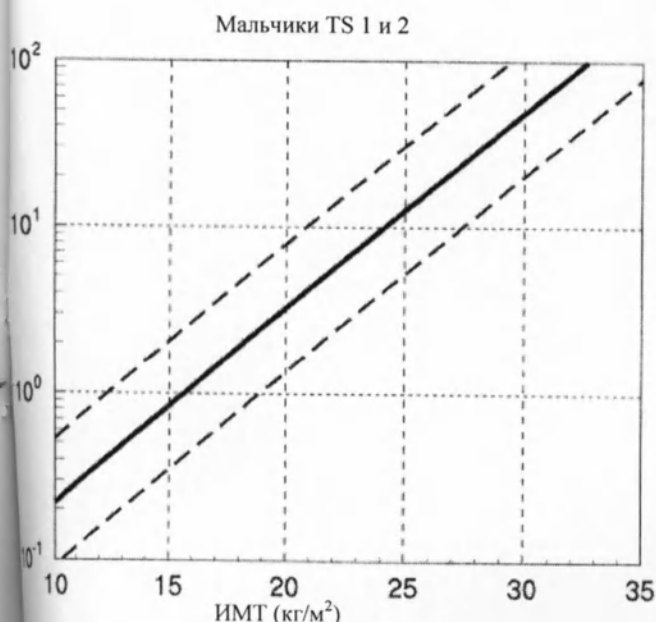


Рисунок 3. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Мальчики TS 1 и TS2 (см. текст).

Таблица 8. Девочки TS 3 и TS 4.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
1	0.32	0.41	0.73	1.29	1.63
2	0.41	0.52	0.92	1.63	2.06
3	0.52	0.66	1.16	2.07	2.61
4	0.65	0.83	1.47	2.61	3.31
5	0.83	1.05	1.87	3.31	4.19
6	1.05	1.33	2.36	4.19	5.30
7	1.33	1.68	2.99	5.30	6.71
8	1.68	2.13	3.78	6.71	8.49
9	2.13	2.69	4.79	8.5	10.8
10	2.69	3.41	6.06	10.7	13.6
11	3.41	4.31	7.67	13.61	17.2
12	4.32	5.46	9.71	17.2	21.8
13	5.46	6.91	12.3	21.8	27.6
14	6.91	8.75	15.6	27.6	34.9
15	8.75	11.1	19.7	34.9	44.2
16	11.1	14.0	24.9	44.2	56.0
17	14.0	17.7	31.6	56.0	70.9
18	17.8	22.5	39.9	70.9	89.7
19	22.5	28.4	50.5	89.7	114.0
20	28.4	36.0	63.9	114.0	144.0
31	36.0	45.6	80.9	144.0	
32	45.6	57.7	80.2	144.0	
33	57.7	73.0	102.0		
34	73.0	92.4	130.0		
35	92.4	117.0			
36	117.0	148.0			
37	148.0				

Девочки TS 3 и 4

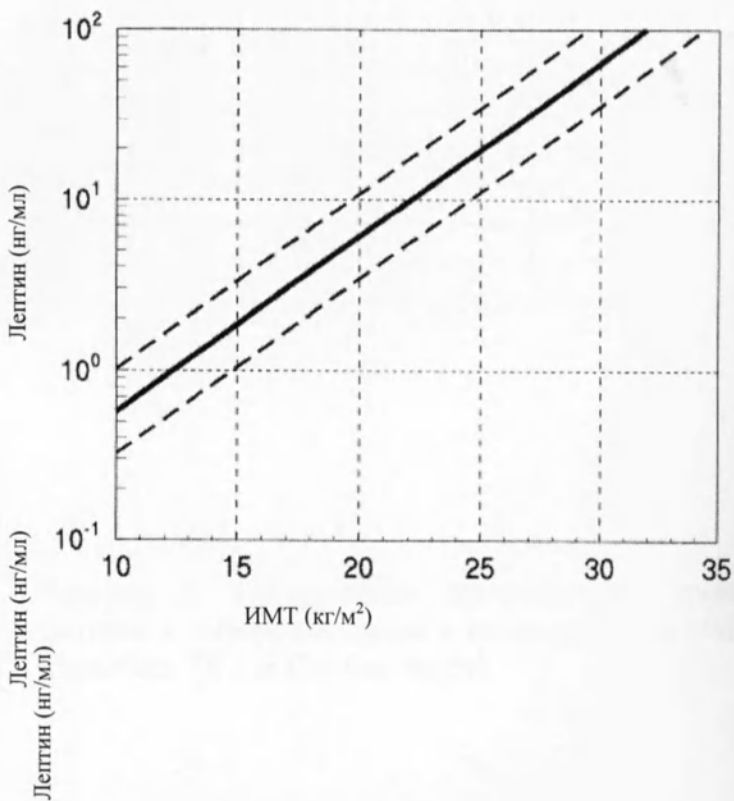


Рисунок 4. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Девочки TS3 и TS4 (см. текст).

Таблица 9. Мальчики TS 3 и TS 4.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
0.03	0.05	0.18	0.58	0.94	
12	0.04	0.07	0.22	0.71	1.16
13	0.49	0.08	0.27	0.88	1.43
14	0.06	0.10	0.33	1.08	1.75
15	0.07	0.12	0.40	1.32	2.16
16	0.09	0.15	0.49	1.63	2.65
17	0.11	0.18	0.61	2.00	3.26
18	0.14	0.23	0.75	2.46	4.01
19	0.17	0.28	0.92	3.03	4.93
20	0.21	0.34	1.13	3.72	6.06
21	0.26	0.42	1.39	4.58	7.46
22	0.32	0.52	1.71	5.63	9.17
23	0.39	0.64	2.10	6.92	11.3
24	0.48	0.78	2.58	8.51	13.9
25	0.59	0.96	3.18	10.5	17.0
26	0.73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0.89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39.0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48.0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3.80	6.20	20.4	67.2	109.0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134.0
36	5.75	9.37	30.9	101.0	
37	7.07	11.5	37.9	124.0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		

Мальчики TS 3 и 4

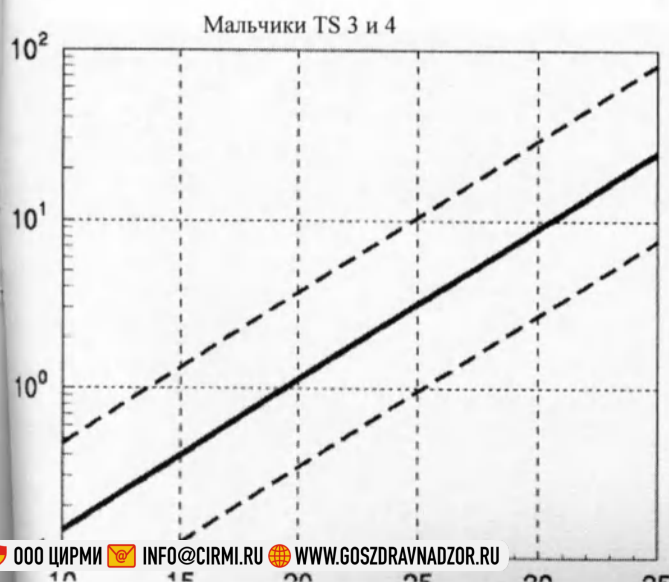


Рисунок 5. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Мальчики TS 3 и TS4 (см. текст).

Таблица 10. Девушки TS 5.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
1	0.50	0.66	1.34	2.71	3.62
2	0.58	0.77	1.56	3.15	4.21
3	0.67	0.89	1.81	3.67	4.89
4	0.78	1.04	2.11	4.26	5.69
5	0.91	1.21	2.45	4.96	6.62
6	1.05	1.41	2.85	5.76	7.70
7	1.22	1.64	3.31	6.70	8.95
8	1.42	1.90	3.85	7.79	10.4
9	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
10	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
11	2.24	2.99	6.05	12.3	16.4
12	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
13	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
14	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
15	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
16	4.76	6.35	12.9	26.0	34.8
17	5.53	7.39	15.0	30.3	40.4
18	6.43	8.59	17.39	35.2	47.0
19	7.48	9.99	20.2	40.9	54.7
20	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
21	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
22	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
23	13.7	18.3	37.0	74.9	99.9
24	15.9	21.2	43.0	87.0	116.0
25	18.5	24.7	50.0	101.0	135.0
26	21.5	28.7	58.1	118.0	
27	25.0	33.4	67.6	137.0	
28	29.1	38.8	78.6		
29	33.8	45.1	91.4		
30	39.4	52.5	106.0		

Девушки TS 5 (< 20 лет)

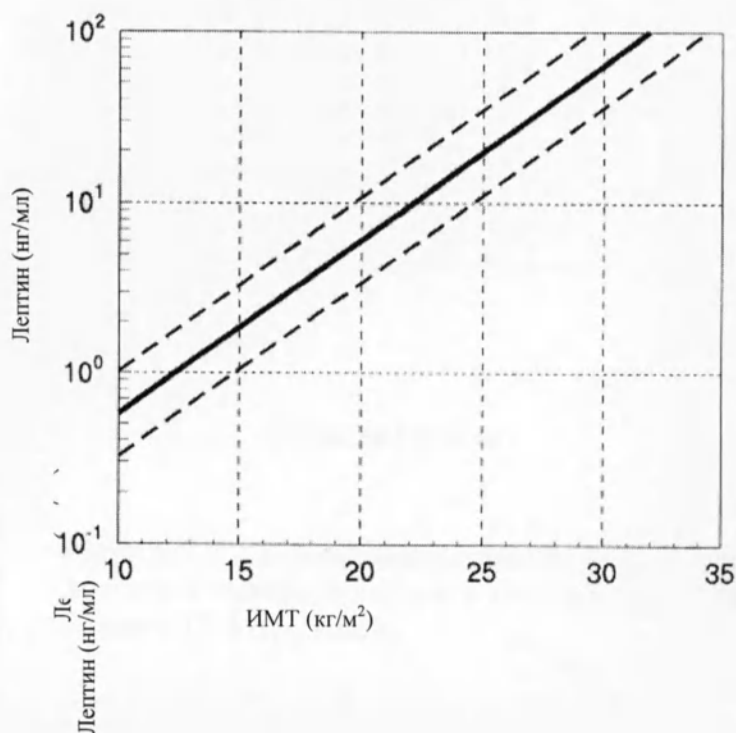
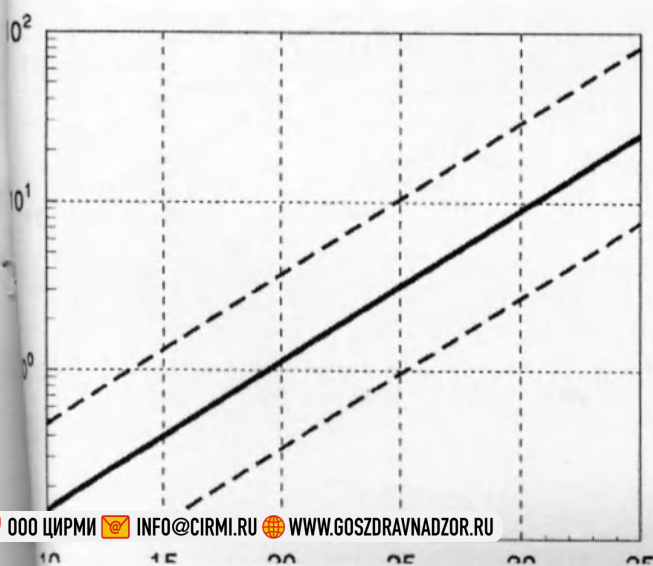


Рисунок 6. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Девушки TS 5 (см. текст).

Таблица 11. Юноши TS 5.

ИМТ (кг/м ²)	Перцентиль (мкг/л)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.16	0.47	0.73
12	0.04	0.06	0.18	0.54	0.84
13	0.05	0.07	0.21	0.62	0.97
14	0.05	0.08	0.24	0.72	1.12
15	0.06	0.10	0.28	0.84	1.30
16	0.07	0.11	0.33	0.97	1.51
17	0.08	0.13	0.38	1.12	1.74
18	0.1	0.15	0.44	1.3	2.02
19	0.11	0.17	0.51	1.50	2.34
20	0.13	0.2	0.59	1.74	2.7
21	0.15	0.23	0.68	2.01	3.13
22	0.17	0.27	0.79	2.33	3.62
23	0.20	0.31	0.91	2.69	4.19
24	0.23	0.36	1.05	3.12	4.85
25	0.27	0.41	1.22	3.61	5.62
26	0.31	0.48	1.41	4.17	6.5
27	0.36	0.55	1.63	4.83	7.52
28	0.41	0.64	1.89	5.59	8.71
29	0.48	0.74	2.19	6.47	10.1
30	0.55	0.86	2.54	7.49	11.7
31	0.64	1.00	2.94	8.67	13.5
32	0.74	1.15	3.4	10.0	15.6
33	0.86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0.99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3

Мальчики TS 3 и 4



Юноши TS 5 (< 20 лет)

Рисунок 7. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Юноши TS 5 (см. текст).

Таблица 12. Женщины.

Перцентиль (мкг/л)	1	5	50	95	99
ИМТ (кг/м ²)					
11	0.46	0.65	1.53	3.59	5.10
12	0.53	0.75	1.77	4.16	5.90
13	0.61	0.87	2.05	4.82	6.83
14	0.71	1.01	2.37	5.58	7.91
15	0.82	1.17	2.75	6.46	9.17
16	0.95	1.35	3.18	7.48	10.61
17	1.10	1.57	3.68	8.66	12.3
18	1.28	1.81	4.27	10.0	14.2
19	1.48	2.10	4.94	11.6	16.5
20	1.71	2.43	5.72	13.4	19.1
21	1.99	2.82	6.62	15.6	22.1
22	2.30	3.26	7.67	18.0	25.6
23	2.66	3.78	8.88	20.9	29.3
24	3.08	4.38	10.3	24.2	34.3
25	3.57	5.07	11.9	28.0	39.7
26	4.13	5.87	13.8	32.4	46.0
27	4.79	6.79	16.0	37.5	53.3
28	5.54	7.87	18.5	43.5	61.7
29	6.42	9.11	21.4	50.4	71.5
30	7.43	10.6	24.8	58.3	82.8
31	8.61	12.2	28.7	67.5	95.8
32	9.97	14.1	33.3	78.2	111.0
33	11.5	16.4	38.5	90.5	129.0
34	13.4	19.0	44.6	105.0	149.0
35	15.5	22.0	51.6	121.0	
36	17.9	25.4	59.8	141.0	
37	20.8	29.5	69.3		
38	24.0	34.1	80.2		
39	27.8	39.5	92.9		
40	32.2	45.7	108.0		

Мужчины (20-80 лет)

Женщины (20-80 лет)

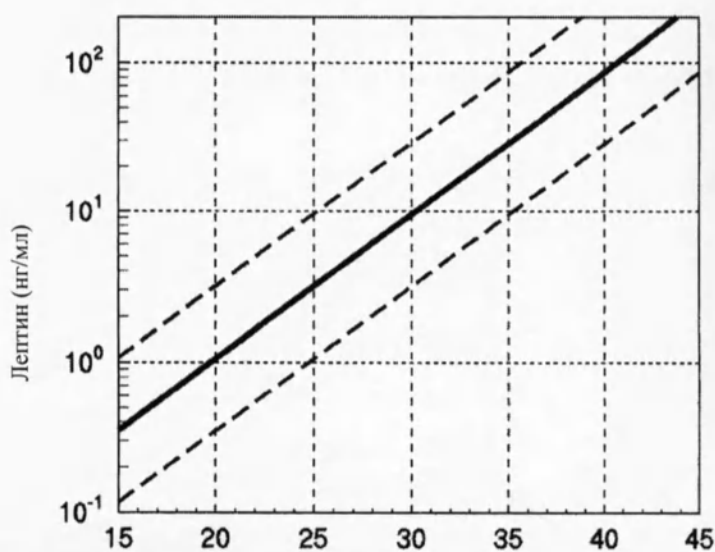
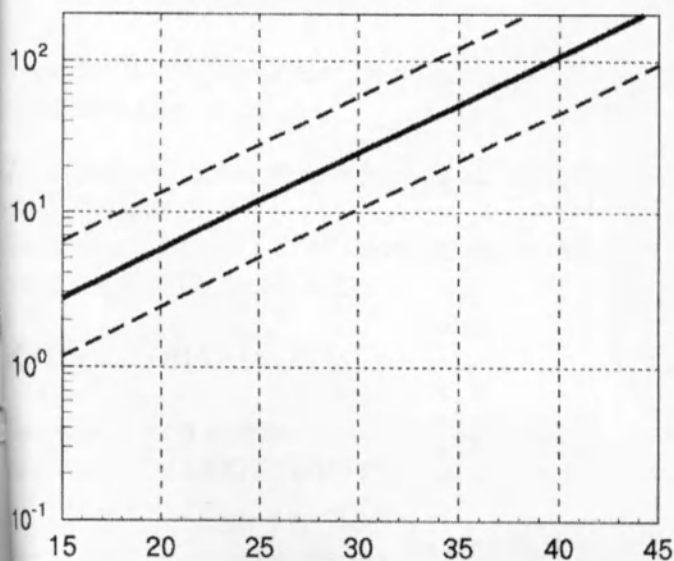


Рисунок 8. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Женщины (см. текст).

Таблица 13. Мужчины.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.15	0.44	0.69
12	0.04	0.06	0.18	0.55	0.87
13	0.05	0.08	0.23	0.69	1.08
14	0.06	0.09	0.28	0.85	1.34
15	0.07	0.12	0.35	1.06	1.67
16	0.09	0.15	0.44	1.33	2.09
17	0.12	0.18	0.55	1.65	2.60
18	0.14	0.23	0.68	2.06	3.24
19	0.18	0.28	0.85	2.57	4.04
20	0.22	0.35	1.06	3.20	5.03
21	0.23	0.44	1.32	3.98	6.27
22	0.35	0.54	1.64	4.97	7.81
23	0.43	0.78	2.05	6.19	9.73
24	0.54	0.85	2.55	7.71	12.1
25	0.67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0.83	1.31	3.96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7.67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36.0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3.89	6.12	18.5	55.8	87.8
34	4.85	7.63	23.0	69.6	109.0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136.0
36	7.53	11.8	35.8	108.0	
37	9.38	14.8	44.6	135.0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		

ИМТ (кг/м²)

Рисунок 9. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Мужчины (см. текст).

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»

Тел./факс (495) 647-2740 (многоканальный),
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор



Долгов В.В.

Всего прошито

и пронумеровано

18 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

2012г.



**Иммуноферментный набор реагентов для количественного
определения Лептина (высококчувствительный метод) Sensitive ELISA.
Производитель: «Медиагност ГмбХ», Германия (Mediagnost GmbH).**

ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ

- Количественное определение лептина как в сыворотке, так и в плазме крови, а также в других биологических жидкостях.
- Калибровано по международным стандартам ВОЗ: NIBSC код 97/594.
- Одиночные стандарты с содержанием лептина человека 0,05, 0,5, 1,5, 3,5 и 5 нг/мл.
- Быстрое проведение анализа: время инкубации составляет 1 час 75 минут.
- 2 контрольные сыворотки для проведения контроля качества в соответствии с «хорошей лабораторной практикой».
- Готовый к использованию конъюгат антител.
- Микропланшет разделен на стрипы.
- Высококчувствительный метод определения лептина (стандарты от 0,05 до 5 нг/мл) позволяет:
 - определять уровень лептина у худощавых пациентов (например, у анорексичных и кахексичных больных), юношей-подростков и раннего возраста;
 - использовать для анализа маленький объем образца;
 - определять низкие концентрации лептина в других образцах, нежели сыворотка, например, в моче, спинномозговой жидкости и т.д.
- Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ОПИСАНИЕ

Лептин – продукт гена ob (1, 2), недавно открытый одноцепочечный протеогормон с молекулярной массой 16 кДа. Предполагают, что он играет ключевую роль в регуляции массы тела и последовательность его аминокислот практически не имеет гомологичных последовательностей с другими белками (1). Лептин синтезируется почти исключительно дифференцированными адипоцитами (3-5). Лептин обладает влиянием на центральную нервную систему, что приводит к снижению потребления пищи и увеличению расходования энергии (2, 6-9). Рецептор лептина – продукт альтернативного сплайсинга разной длины, принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов I типа (10 - 12). Лептин в организме человека распространен повсеместно (10, 11, 13, 14), что позволяет предположить его участие во многих физиологических процессах, но функции лептина до конца не изучены. Циркулирующая форма рецептора лептина – один из лептин связывающих белков (15). Помимо метаболических эффектов лептин имеет выраженное влияние на ряд эндокринных механизмов. У самцов мышей лептин уменьшает индуцируемое голоданием снижение уровней лютеинизирующего гормона, тестостерона, тироксина и увеличение АКТГ и кортикостерона. У самок мышей лептин предупреждает индуцируемую голоданием задержку овуляции (16). Мыши ob/ob с генетическим дефектом лептина бесплодны. Этот дефект можно скорректировать при введении лептина, но не за счет снижения массы тела при голодании (17). Это доказывает, что лептин является одним из основных регуляторов репродуктивных функций.

Все эти эффекты, как минимум частично, можно объяснить супрессивным эффектом лептина на экспрессию и секрецию нейростатина Y (NPY) нейронами в дугообразном ядре гипоталамуса (6, 18, 19). Как известно, NPY является сильным стимулятором аппетита (20, 21) и участвует в регуляции синтеза различных гормонов гипофиза, например, снижает уровень соматотропного гормона роста за счет стимуляции соматостатина (22, 23), снижения уровня гонадотропина (23) или стимуляции гипофизарно – адреналовой системы (21).

Наиболее сильным регулятором уровня лептина является количество жировой ткани тела (24-26). Очевидно, при регулярном приеме пищи, уровень лептина отражает долю жировой ткани (27), обнаружена экспоненциальная связь (37). Этот конституционный опосредованный синтез лептина регулируется рядом негормональных и гормональных факторов. Стимуляторами синтеза лептина как у грызунов, так и у человека является переедание (28,29), инсулин (3,5,30-33) и глюкокортикоиды (5, 34-36). Снижение синтеза лептина обнаружено при голодании (27), использовании циклического аденозинмонофосфата и агонистов β -3-адренорецепторов (35). Из приведенных выше данных становится очевидным, что лептин является составляющей частью различных метаболических и эндокринных механизмов (т.н. «обратных связей») (38). Для клинического использования важно отметить, что уровень лептина в сыворотке крови подвержен умеренным циркадным изменениям, пик содержания лептина приходится примерно на два часа ночи (37). Уровень лептина в это время на 30 - 100 % выше, чем уровень в утренние часы или рано днем. Так как существуют циркадные изменения, и влияние приема пищи на уровень лептина необходимо учитывать условия сбора образцов крови. При стандартизации условий сбора крови - регулярном приеме пищи и сборе крови в утренние часы или рано днем, измерение уровня лептина является высоко информативным.

Для адекватной интерпретации измеренных уровней лептина необходимо использовать референсные значения. Поскольку масса жировой ткани является главным фактором, влияющим на уровень лептина, измеренные значения должны быть соотнесены с долей жировой ткани, оцененной по индексу масса-тело (ИМТ) или с использованием метода биоэлектрического сопротивления. Уровни лептина у женщин выше, чем у мужчин (38,39), у детей и подростков уровень лептина зависит также от полового развития и возраста (40). Поэтому, референсные значения лептина должны быть стратифицированы по полу и половому развитию.

Уровни лептина у наиболее тучных пациентов высокие, что позволяет предположить отсутствие чувствительности к лептину (20,26,37,38,41,42). У небольшого количества пациентов, несмотря на выраженное ожирение, уровни лептина были чрезвычайно низкими. Необходимо проведение дальнейших исследований этого нового патофизиологического состояния – дефицит лептина. Так как лептин играет важную роль в реализации репродуктивных функций, изучение связи сниженных уровней лептина с бесплодием позволит выявить новые патофизиологические механизмы развития данного заболевания.

крытие лептина стимулировало проведение огромного количества научных исследований, посвященных изучению регуляции синтеза и эффектов этого нового гормона. Что наиболее важно, эти исследования позволили лучше понять физиологические механизмы регуляции массы тела и представить возможные патофизиологические механизмы развития ожирения и расстройств пищевого поведения. Кроме того, предложены возможные патофизиологические механизмы развития некоторых видов бесплодия.

Как лептин обладает множеством функций, он представляет большой интерес как перспективный маркер, который можно использовать в клинической лабораторной практике диабетологов, эндокринологов, гинекологов, андрологов, например для мониторинга больных с метаболическим синдромом, ожирением, кахексией, бесплодием и другими заболеваниями.

Измерение измеренных уровней лептина к референсным значениям в соответствии с ИМТ позволит определить возможную причину ожирения у конкретного пациента: дефицит лептина или резистентность к нему.

Из-за высокой корреляции лептина с массой жировой ткани измерение его при стандартизированных условиях можно использовать в качестве простого и недорогого теста для оценки массы жировой ткани.

ЗНАЧЕНИЕ

Этот метод предназначен для измерения лептина человека в образцах человеческой сыворотки или плазмы, а также в моче, слюне, спинномозговой жидкости, грудном молоке и культуральной среде адипоцитов, высокочувствительным методом, в научных и диагностических целях.

Использованием данной тест-системы возможно определение уровня лептина у анорексичных или кахексичных пациентов, детей раннего возраста даже в очень низких концентрациях.

Для определения уровня лептина обычным, не высоко чувствительным, методом (например, в образцах сыворотки или плазмы крови с ожидаемой концентрацией лептина 1-100 нг/мл) рекомендуем использовать тест-систему Human-Leptin ELISA Standard E07.

АГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

	Реагент
1) MTP	96-луночный микропланшет , готов к использованию: 12 «ломаемых» стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к лептину, в пакете.
2) CAL	Стандарты А-Е , лиофилизированные, содержат рекомбинантный лептин. Стандарты (каждый) должны быть растворены в 1000 мкл буфера VP для образцов . Растворенные стандарты могут храниться при -20°C . Перед использованием замороженных стандартов их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа. Концентрации стандартов в диапазоне 0,05-5 нг/мл (0,05; 0,5; 1,5; 3,5 и 5 нг/мл) рекомбинантного лептина человека.
3) BUF VP	Буфер для разведения VP , 25 мл, готов к использованию, используйте для разведения стандартов и контрольных сывороток KS1 и KS2 .
4) Control	Контрольные сыворотки KS1 и KS2 , по 250 мкл, лиофилизированные, содержат человеческую сыворотку и должны быть растворены каждая в 250 мкл буфера VP для образцов. Требуемый уровень и допустимые значения лептина указаны на этикетках флаконов. Растворенные контрольные сыворотки могут храниться при -20°C . Перед использованием замороженных контрольных сывороток их необходимо быстро разморозить (при температуре не выше комнатной, не используйте интенсивное перемешивание на вортексе), показано, что 3 цикла замораживания/оттаивания не влияют на результаты анализа.
5) AbCONJ	Конъюгат антител POD AK , 12 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные антитела к лептину и конъюгат HRP (пероксидаза хрена) – стрептавидин. Используйте по 100 мкл на лунку в анализе.
6) WASHBUF 20x	Буфер для промывок (WP) , 50 мл, концентрат 20X. Концентрат буфера для промывок (WP) должен быть разведен в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием (например, внесите полностью содержимое флакона с концентратом буфера для промывок (50 мл) в градуированный стакан и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой). Внимание: после разведения готовый буфер для промывок стабилен 4 недели, разводите только необходимое количество буфера.
7) SUBST	Субстратный раствор (S) , 12 мл, готов к использованию, субстрат фермента пероксидаза хрена HRP, стабилизированный H_2O_2 тетраметилбензидин (ТМБ).
8) H_2SO_4	Стоп-раствор (SL) , 12 мл, готов к использованию, 0,2 М серная кислота. Внимание: кислота!
9)	Адгезивная пленка для заклеивания стрипов, 2х.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки одноканальные и многоканальные переменного объема, на 100 – 200 мкл, с одноразовыми пластиковыми наконечниками
- Дистиллированная или деионизированная вода для разведения буфера для промывок (WP)
- Вортекс
- Устройство для аспирирования стандартов и образцов из лунок (рекомендуется использовать, так как существует потенциальная опасность инфицирования материалами человеческого происхождения)
- Таймер (с возможностью установки до 120 минут)
- Ванночки для реагентов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство, шейкер (рекомендуется)
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и фильтром сравнения 620 нм (или 590 нм)
- Устройство для сваривания фольги ламинированных пакетов (рекомендуется)

РЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики in-vitro и только для профессионального использования.

Перед началом анализа полностью и тщательно прочитайте данную инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции. Убедитесь, что вы полностью поняли инструкцию. Производитель Mediagnost GmbH не несет ответственности и не принимает претензий за любые потери и повреждения, произошедшие из-за несоблюдения данной инструкции.

Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры 20-25°C. При наличии преципитатов в буферах их перед использованием растворите их при перемешивании и согревании.

Не смешивайте реагенты разных серий. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Микропланшет содержит «ломаемые» стрипы в рамке – держателе. Неиспользуемые стрипы необходимо хранить при 2-8°C в стабилизированном пакете.

Внимание: набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Источники человеческой сыворотки были протестированы методами, одобренными FDA, на содержание поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С (CV), вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 (HIV), и для всех тестов были получены отрицательные результаты. Так как ни один из известных тестов не гарантирует полностью отсутствие инфекционных агентов, со всеми компонентами, содержащими материалы человеческого происхождения, и образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Ведущие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% раствор 2-метил-4-изотиазолина-3-один: **AK, VP**.

4 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

3 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

6 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

6/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

5 При несчастных случаях или плохом самочувствии обратитесь к врачу

Ведущие компоненты содержат в качестве консерванта < 0,01% (w/w) раствор 5-хлор-2-метил 2Н изотиазол-3-один и 2 метил-2Н-изотиазол-3-один: **AK, VP, WP**.

6/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

3 Возможна сенсибилизация при контакте с кожей

6 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

8.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

гоп-раствор содержит 0,2 М серную кислоту (H₂SO₄)

6/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз и кожи

6 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

8.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

6/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

Вносите образцы и реагенты с максимально возможной скоростью, с постоянной последовательностью на разных этапах.

Используйте новые одноразовые наконечники для внесения каждого образца, контроля и реагента для предотвращения перекрестной контаминации.

Используйте отдельные емкости для каждого реагента. Это особенно важно для емкости для субстрата. Использование ванночки для субстрата, в которой до этого находился раствор конъюгата, может привести к окрашиванию раствора субстрата. Не сливайте реагенты из ванночек обратно во флаконы, так как это может привести к загрязнению реагентов!

Тщательно перемешивайте содержимое лунок микропланшета для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно. Не позволяйте лункам высыхать во время тестирования, вносите реагенты немедленно после завершения промывки.

Субстрат TMB (S) содержит 3,3',5,5' тетраметилбензидин. Храните и инкубируйте в темноте.

20/21/R22 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании

6/37/38 Раздражающее вещество, вызывает раздражение глаз, дыхательной системы и кожи

6 При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу

8.1 При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды

6/37 Используйте соответствующую защитную лабораторную одежду и перчатки

бщие процедуры первой помощи:

Контакт с кожей: промойте область контакта большим количеством воды. Выбросьте загрязненную одежду обувь.

Контакт с глазами: при попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Проглатывание: при проглатывании тщательно промойте рот большим количеством воды. Немедленно обратитесь к врачу.

Не ешьте, не пейте и не курите в помещении, где используется набор.

Никогда не пипетируйте ртом.

Разлитый материал необходимо немедленно вытереть и продезинфицировать поверхность. Для очистки контаминированных поверхностей оборудования используйте соответствующий детергент.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод Mediagnost ELISA E77 определения лептина основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов специфических высоко аффинных антител к этому белку. Лептин, присутствующий в образце, связывается с первыми антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. На следующем этапе, биотинилированные вторые специфические антитела к лептину и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, в свою очередь, связываются с лептином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Субстратная реакция приводит к изменению окрашивания жидкости в лунках, интенсивность которого зависит от количества лептина в образце.

БОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

образцы

Данным методом могут быть протестированы образцы сыворотки и плазмы крови, а также мочи, слюны, спинномозговой жидкости, грудного молока и культуральной среды.

Не обнаружено существенных отличий при определении уровня лептина высокочувствительным методом в сыворотке и ЭДТА плазме крови. При использовании для анализа цитратной плазмы крови рекомендовано провести разведение образцов, измеренный уровень лептина может быть несколько ниже.

Бор образцов крови для последующей подготовки сыворотки должен проводиться по стандартной методике венепункции. Избегайте использования гемолизированных образцов. Образец крови необходимо инкубировать для образования сгустка и после полного его разложения, отделите сыворотку центрифугированием.

При нормальном режиме питания обследуемого взятие крови необходимо проводить утром или рано днем, так как существуют циркадные изменения уровня лептина с максимальным его значением к двум часам ночи.

хранение образцов

Хранение при комнатной температуре: максимально 2 дня
Хранение при -20°C : максимально 2 года
Размораживание и оттаивание образцов более чем 5 раз недопустимо.

Подготовка образцов

Для клинических исследований сыворотки или плазмы крови рекомендовано проводить стандартное разведение 1:10 буфером для разведения VP.

Предложения по проведению разведения.

Например, в пробирку типа Эппендорф с 225 мкл буфера для разведения (VP) внесите 25 мкл сыворотки или плазмы (разведение 1:10) (при проведении большой серии разведений рекомендуем использовать многоканальные пипетки). После перемешивания используйте 2х100 мкл того разведения образцов (1:10) для анализа.

Если ожидаемая концентрация лептина превышает 50 нг/мл, то образцы рекомендовано развести в большем разведении буфером для разведения (VP) (например, 1:20).

Концентрация лептина (высокочувствительный метод) в других биологических жидкостях человека, нежели сыворотка или культуральная среда, может существенно отличаться. В грудном молоке и моче концентрации лептина очень низкие. Данные образцы рекомендовано развести 1:5. Использование для анализа неразведенных образцов может существенно влиять на протекание реакций, а определяемые уровни лептина могут быть занижены (см. характеристики тест-системы и валидация).

ХИМИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование должно выполняться в строгом соответствии с данной инструкцией.

Смешивайте реагенты из наборов разных лотов. Невскрытые микропланшеты и реагенты стабильны до срока годности, указанного на этикетке набора, при условии хранения в защищенном от света месте, при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$.

Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры ($20-25^{\circ}\text{C}$). Если в буферах образовались преципитаты, то необходимо растворить перед использованием буфера перемешиванием и/или нагреванием.

Инкубация при комнатной температуре означает инкубацию при $20-25^{\circ}\text{C}$.

Инкубацию рекомендовано проводить при перемешивании микропланшета на шейкере (например, при 350 rpm). В зависимости от химических характеристик шейкера, частота вращения может быть добавлена. Недостаточное перемешивание реакционной смеси может привести к снижению оптической плотности, получению ложно заниженных результатов. При избыточном перемешивании оптическая плотность может быть высокой, а результаты – ложно завышенными.

Тщательная промывка лунок микропланшета является важным условием получения точных и воспроизводимых результатов анализа. Неполная промывка на любом этапе негативно влияет на точность результатов и может привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Для промывки используйте только буфер, поставляемый с тест-системой и разведенный в правильной пропорции. На каждый цикл промывки используйте как минимум 300 мкл буфера для промывок на одну лунку.

При проведении промывки учитывайте наличие потенциальной биологической инфекционной опасности. При использовании автоматических промывающих устройств для микропланшета тщательно следуйте указаниям в инструкции по применению. Следите за правильностью установки параметров микропланшета и промывки. При внесении и аспирации промывающего раствора иглы диспенсера не должны поцарапать дно лунок планшета.

При отсутствии автоматического промывающего устройства можно использовать ручной метод промывки. Для внесения буфера для промывки используйте многоканальные пипетки, шприцевой дозатор или другие устройства. Жидкость из лунок может быть удалена при легком постукивании микропланшета о резервуар для слива (раковину). Максимально удаляйте промывочный буфер из лунок между циклами промывки. Если используются аспирационные устройства, следите за тем, чтобы дно лунок микропланшета не было поцарапано.

После последнего цикла промывки аккуратно постучите микропланшетом по фильтровальной бумаге для полного удаления жидкости.

БЕЗОПАСНОСТЬ:

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Утилизировать неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

СТАНДАРТЫ И КОНТРОЛИ

Для растворения лиофилизированных компонентов (стандарты А - Е и контроли KS1 & KS2) используйте буфер VP для разведения. Растворенные реагенты рекомендуется оставить при комнатной температуре на 15 минут и затем тщательно, но аккуратно перемешать (без образования пены) на вортексе.

Растворенные стандарты и контроли могут храниться 2 месяца при -20°C . Не допускайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

БУФЕР ДЛЯ ПРОМЫВОК

Приготовьте необходимое количество буфера для промывок, для этого разведите в 20 раз дистиллированной или деионизированной водой концентрат 20х буфера для промывок. Готовый буфер для промывок стабилен 4 недели при $2-8^{\circ}\text{C}$. Перед использованием буфер должен достичь комнатной температуры.

МИКРОПЛАНШЕТ

Храните неиспользованные микропланшетные стрипы в тщательно закрытом пакете с осушителем, при $2-8^{\circ}\text{C}$, используйте рамку-держатель, поставляемую с набором. При правильном хранении стрипы стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ: все определения (стандарты, контроли, образцы) необходимо тестировать в дублях. Для получения оптимальных результатов необходимо строго соблюдать данную инструкцию и использовать правильную технику пипетирования.

При выполнении анализа стандарты, контроли и образцы необходимо вносить как можно быстрее (<15 минут). Все инкубации должны проводиться при комнатной температуре ($20-25^{\circ}\text{C}$)! Интенсивность встряхивания на шейкере не должна превышать 350 rpm!

Для того чтобы избежать искажений, вызванных различием во времени инкубации, конъюгат антител АК, раствор субстрата S и стоп-раствор SL необходимо вносить в лунки микропланшета в одинаковом порядке и с одинаковой скоростью.

Внесите во все лунки по 100 мкл буфера для разведения VP. Внесите в соответствующие лунки по 100 мкл стандартов, разведенных контрольных сывороток или разведенных образцов в соответствующие лунки.

- 2) Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **1 часа при комнатной температуре** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).
- 3) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, используя по **300 мкл буфера для промывок WP** на лунку на один цикл промывки. Желательно, чтобы инкубация с буфером для промывок WP длилась не менее 15 секунд на цикл.
- 4) Немедленно после последнего цикла промывки внесите по **100 мкл ферментного конъюгата АК** в каждую лунку. Закройте лунки микропланшета пленкой и инкубируйте в течение **30 минут** (при возможности используйте шейкер ≤ 350 rpm).
- 5) После окончания инкубации аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки 3 раза, как это указано в шаге 3.
- 6) Внесите по **100 мкл раствора субстрата TMB** в каждую лунку.
- 7) Инкубируйте в течение **15 минут в темноте при комнатной температуре (20 - 25°C)**.
- 8) После окончания инкубации внесите по **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку.
- 9) Измерьте оптическую плотность при **450 нм** не позднее чем через **30 минут** после внесения стоп-раствора (длина волны сравнения ≥ 590 нм, например, 620 нм).

СЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки результатов данного анализа необходимо, чтобы значение ОП бланка было ниже 0,25, а значение ОП стандарта Е было выше 0. В образцах, в которых ОП выше ОП стандарта Е (то есть, вне калибровочной кривой), определение концентрации лептина может дать точные результаты. Необходимо повторно протестировать данные образцы при разведении.

Построение калибровочной кривой

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями лептина.

Стандарт	A	B	C	D	E
мкл	0,05	0,5	1,5	3,5	5

Рассчитайте **среднее значение ОП** дублей бланка (лунки A1/A2).

Вычитите полученное среднее значение ОП бланка из рассчитанных средних значений ОП дублей всех образцов, стандартов и контролей.

Постройте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов по оси X против соответствующих средних значений ОП стандартов по оси Y, используя полулогарифмическую графическую бумагу (lin-log).

Рекомендации: расчет калибровочной кривой желательно выполнять с помощью соответствующего программного обеспечения, так как обычная калибровочная кривая (без соответствующей трансформации) не линейна. Для построения калибровочной кривой обычно могут быть использованы **полиномы более высокой степени или четырехпараметрическая логистическая (4-PL) регрессия, или нелинейная регрессия** (сплайн, построение от точки к точке).

Концентрация лептина в разведенных в образцах или контрольных сыворотках KS1 и KS2 измеряется в нг/мл. Значение концентрации лептина, полученное по калибровочной кривой умножьте на **фактор разведения**.

На рисунке представлен пример построения калибровочной кривой. Не используйте для подсчета результатов при проведении анализа калибровочную кривую необходимо строить при каждом проведении анализа!

Пример подсчета концентрации лептина в неразведенных образцах.

П в тестируемом образце 0,293

П в бланке 0,015

Программное обеспечение позволяет автоматически вычислить концентрацию лептина в разведенном образце, используя разницу ОП в образце и бланке. Для определения концентрации лептина используйте наиболее подходящую калибровочную кривую (здесь: полиномиальную, двухуровневую).

В данном примере для вычисления концентрации лептина в образце программным обеспечением предложено следующее уравнение:

$$0,278 = -0,0089658 + 0,64743x - 0,034025x^2$$

$$4,524 = x$$

Так как образец разведенный (1:10), то концентрация лептина составила $0,4524 \times 10$ нг/мл = 4,4524 нг/мл.

$$\text{Grp. 1: } y = -0,0089658 + 0,64743 * x - 0,034025 * x^2 \quad d = 0,014831$$

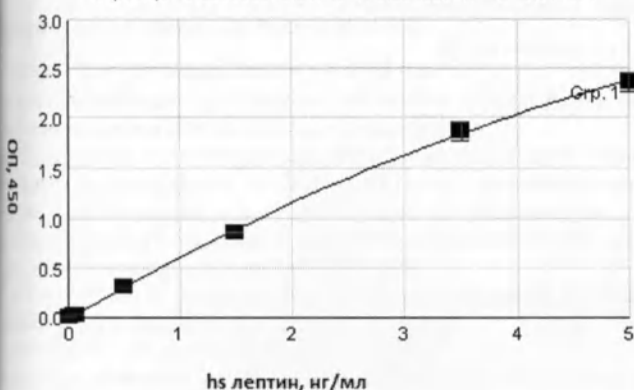


Рисунок 1. Пример калибровочной кривой

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВАЛИДАЦИЯ

В качестве стандартов в наборе ELISA E77 используется нативный человеческий **лептин** с концентрациями **0,05; 0,5; 1,5; 3,5; и 5 нг/мл**.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода ELISA E77 составляет $< 0,01$ нг/мл ($2 \times \text{SD}$ нулевого стандарта в 12 повторях).

Специфичность

Данная тест-система высоко специфична для лептина.

При использовании данной тест-системы были протестированы образцы сыворотки следующих видов животных: лошадь, корова, курица, ролик, собака, морская свинка, овца, мышь, коза, осел, крыса, кошка, свинья. Перекрестной реакции обнаружено не было.

Воспроизводимость и точность

Коэффициенты вариации между и внутри серии составили менее 10%. Типичные примеры определений приведены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1. Воспроизводимость между сериями.

	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)	VC
образец 1	2.04	0.147	7.2
образец 2	6.93	0.423	6.1
образец 3	14.86	1.11	7.5

Таблица 2. Воспроизводимость внутри серии.

	Количество определений	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)
образец 1	22.44	1.28	4.35
образец 2	4.1	0.108	2.63

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень лептина в основном определяет количество жировой ткани. У худых лиц уровень лептина низкий, у страдающих ожирением – высокий. Кроме того, существуют четкие гендерные отличия, у женщин уровень лептина выше, чем у мужчин. Также уровень лептина зависит от полового развития. Поэтому всегда при определении референсных значений нужно учитывать влияние этих факторов. Существует несколько методов оценки доли жировой ткани в организме, такие как подсчет индекса масса-тело (ИМТ) (вес (кг) разделенный на квадрат роста (м)), оценка биоэлектрического сопротивления и результатов двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии тела. Хотя ИМТ для оценки реального количества жировой ткани гораздо ниже, чем двух других современных методов, но ИМТ имеет следующие преимущества:

- 1) не зависит от применения регрессионных моделей
- 2) просто определить, необходимы только данные о массе тела и росте
- 3) в большинстве случаев эти данные можно оценить ретроспективно
- 4) более точная оценка при быстром изменении массы жировой ткани, например, при голодании.

Поэтому ожидаемые значения соотносятся с ИМТ, как наиболее сильным независимым регулятором уровня лептина, а также с полом и степенью полового развития (45; см. рисунки 2-9 и таблицы 4-11). Среди обследуемых старше 20 лет не выявлено значительных влияний возраста на уровень лептина. Эти референсные значения, соотношенные с полом и половым развитием, можно использовать для сравнения измеренного уровня лептина с ИМТ у здоровых лиц и выявления патологических изменений. Наиболее подходящей для различных групп является экспоненциальная регрессионная прямая следующего вида:

$$\text{лептин} = a * e^{(b * \text{ИМТ})}$$

Для подсчета 5 и 95 перцентилей используются следующие уравнения:

$$\text{лептин} = a * e^{(b * \text{ИМТ} - c)}$$

$$\text{лептин} = a * e^{(b * \text{ИМТ} + c)}, \text{ соответственно.}$$

На полулогарифмической шкале (ось $Y = \log \text{ лептин}$), это уравнение дает прямую линию. В таблице 5 представлены коэффициенты a , b , c в соответствии с полом и степенью полового развития у детей и подростков, а также у взрослых. С использованием этих коэффициентов можно определить референсные значения лептина для низких и высоких значений ИМТ.

Пример:

0 перцентиль лептина для мальчиков со степенью полового развития 3 и 4 определен по следующему уравнению:

$$\text{лептин} = 0,0181 * e^{(0,2067 * \text{ИМТ})}$$

$$\text{перцентиль составил: Лептин} = 0,0181 * e^{(0,2067 * \text{ИМТ} - 1,1919)}$$

$$5 \text{ перцентиль составил: Лептин} = 0,0181 * e^{(0,2067 * \text{ИМТ} + 1,1919)}$$

На полулогарифмическом графике эти прямые параллельны и находятся на одинаковом расстоянии от прямой 50 перцентилей.

Оценка девиации от стандартного отклонения

Добный метод для обнаружения отклонения измеренной концентрации лептина от соответствующего референсного уровня – это подсчет стандартного отклонения, с учетом ИМТ, пола и полового развития, и выражается девиацией от стандартного отклонения (SDS). Этот метод можно рассматривать как нормализацию по референсным значениям у здоровых лиц. Таким образом, уровни лептина могут быть соотношены с ИМТ, половым развитием и возрастом (то есть, исключено влияние пола, полового развития, возраста и ИМТ), а данные могут быть объединены для дальнейшего анализа.

В соответствии с логарифмическим распределением уровней лептина, девиация стандартных отклонений может быть оценена по следующему уравнению:

$$\text{Лептин SDS} = (\ln(\text{лептин}) - \ln(a) - b * \text{ИМТ}) / d$$

Исходя из уравнения $\ln$ представлен натуральным логарифмом (по основанию e). Константы a , b и d получены из таблицы 5 в зависимости от пола и степени полового созревания/возраста.

Например:

Мальчики степень полового развития по Tanner 3, ИМТ = 25 кг/м^2 , измеренная концентрация лептина = 5 нг/мл.

$$\text{SDS лептин} = (\ln(5) - \ln(0,0181) - 0,2067 * 25) / 0,6850 =$$

$$1,6094 - (-4,0118) - 5,1675 / 0,6850 = 0,66$$

Определение оптимального разведения образцов

Так как уровень лептина в сыворотке крови сильно зависит от влияния разных факторов, например, от массы жировой ткани, оптимальное разведение образцов необходимо для точного определения уровня лептина. Образцы должны быть разведены таким образом, чтобы полученные концентрации лептина (с учетом фактора разведения) были в области калибровочной кривой.

Референсные значения позволяют точно определить ожидаемые значения концентрации лептина в тестируемом образце в зависимости от ИМТ, пола и возраста и оптимальное разведение тестируемых образцов.

Пример 1:

взрослая женщина, ИМТ = 35 кг/м^2 . Из референсных значений для взрослых женщин с ИМТ = 35 кг/м^2 , ожидаемый уровень лептина составляет 50 нг/мл. Оптимальное разведение составляет 1:20.

Пример 2:

ники, препубертатный период, ИМТ = 24 кг/м². Из референсных значений для мальчиков со степенью полового развития по Tanner 1 и 2, видимый уровень лептина составляет 10 нг/мл. Оптимальное разведение составляет 1:10.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 3. Константы a, b, c, d для подсчета референсных значений лептина и стандартного отклонения на основании ИМТ (см. раздел «Материалы и методы» для получения нормальных значений).

Популяция здоровых лиц стратифицирована по полу, половому развитию/возрасту.

Пол	количество	a	b	c	d
Мальчики					
1 и 2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
3 и 4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Всего	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Девочки					
1 и 2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
3 и 4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Всего	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

1 – степень полового созревания по Tanner

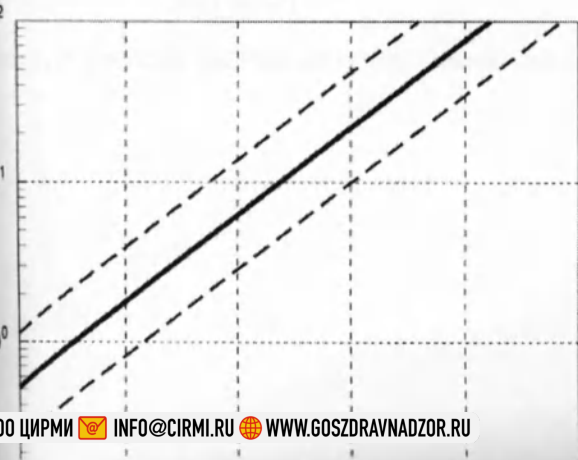
n – количество обследуемых

a, b, c, d – константы (см. текст)

Таблица 4. Девочки TS 1 и TS 2.

Перцентиль (мкг/л)	1	5	50	95	99
0.22	0.30	0.66	1.45	1.99	
0.28	0.39	0.85	1.86	2.56	
0.36	0.50	1.09	2.38	3.29	
0.46	0.64	1.40	3.06	4.22	
0.60	0.82	1.79	3.93	5.42	
0.76	1.05	2.30	5.04	6.96	
0.98	1.35	2.95	6.47	8.93	
1.25	1.73	3.79	8.31	11.5	
1.61	2.22	4.87	10.7	14.7	
2.07	2.85	6.25	13.7	18.9	
2.65	3.66	8.03	17.6	24.3	
3.41	4.70	10.3	22.6	31.2	
4.37	6.03	13.2	29.0	40.0	
5.62	7.75	17.0	37.2	51.4	
7.21	9.95	21.8	47.8	65.9	
9.26	12.8	28.0	61.4	84.7	
11.9	16.4	35.9	78.8	109.0	
15.3	21.1	46.1	101.0	140.0	
19.6	27.0	59.2	130.0		
25.2	34.7	76.1			
32.3	44.6	97.7			
41.5	57.2	125.			
53.2	73.4	0			
68.4	94.3				
87.8	121.				
113	0				
145					

Девочки TS 1 и 2



Лептин (нг/мл)

Рисунок 2. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Девочки TS 1 и TS2 (см. текст).

Таблица 5. Мальчики TS 1 и TS 2.

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
11	0.08	0.12	0.29	0.69	0.99
12	0.01	0.16	0.38	0.91	1.30
13	0.14	0.20	0.49	1.19	1.71
14	0.19	0.26	0.65	1.56	2.24
15	0.24	0.35	0.85	2.04	2.93
16	0.32	0.46	1.11	2.68	3.84
17	0.41	0.60	1.45	3.51	5.04
18	0.55	0.79	1.90	4.60	6.60
19	0.72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0.94	1.35	3.27	7.90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3.99	9.66	23.3	33.5
25	3.65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7.78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98.8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129.0
30	14.1	20.3	48.9	118.0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110.0		
34	41.7	59.8	144.0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102.0			
37	93.9	134.0			
38	123.0				

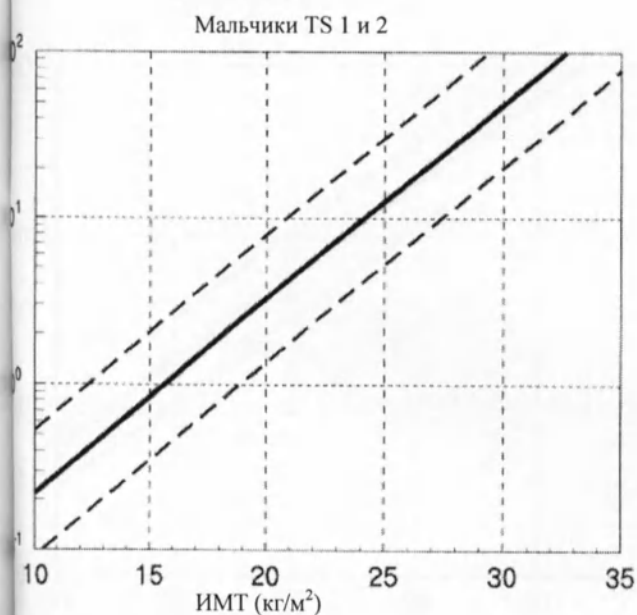


Рисунок 3. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Мальчики TS 1 и TS2 (см. текст).

таблица 6. Девочки TS 3 и TS 4.

Перцентиль (мкг/л)					
1	5	50	95	99	
0.32	0.41	0.73	1.29	1.63	
0.41	0.52	0.92	1.63	2.06	
0.52	0.66	1.16	2.07	2.61	
0.65	0.83	1.47	2.61	3.31	
0.83	1.05	1.87	3.31	4.19	
1.05	1.33	2.36	4.19	5.30	
1.33	1.68	2.99	5.30	6.71	
1.68	2.13	3.78	6.71	8.49	
2.13	2.69	4.79	8.5	10.8	
2.69	3.41	6.06	10.7	13.6	
3.41	4.31	7.67	13.61	17.2	
4.32	5.46	9.71	17.2	21.8	
5.46	6.91	12.3	21.8	27.6	
6.91	8.75	15.6	27.6	34.9	
8.75	11.1	19.7	34.9	44.2	
11.1	14.0	24.9	44.2	56.0	
14.0	17.7	31.6	56.0	70.9	
17.8	22.5	39.9	70.9	89.7	
22.5	28.4	50.5	89.7	114.0	
28.4	36.0	63.9	114.0	144.0	
36.0	45.6	80.9	144.0		
45.6	57.7	80.2	144.0		
57.7	73.0	102.0			
73.0	92.4	130.0			
92.4	117.0				
117.0	148.0				
148.0					

Девочки TS 3 и 4

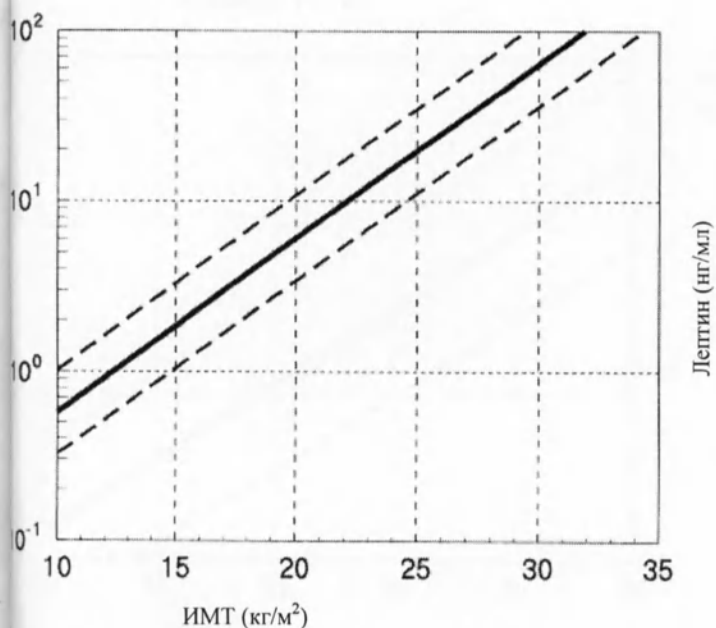


Рисунок 4. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Девочки TS 3 и TS4 (см. текст).

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
0.03	0.05	0.18	0.58	0.94	
12	0.04	0.07	0.22	0.71	1.16
13	0.49	0.08	0.27	0.88	1.43
14	0.06	0.10	0.33	1.08	1.75
15	0.07	0.12	0.40	1.32	2.16
16	0.09	0.15	0.49	1.63	2.65
17	0.11	0.18	0.61	2.00	3.26
18	0.14	0.23	0.75	2.46	4.01
19	0.17	0.28	0.92	3.03	4.93
20	0.21	0.34	1.13	3.72	6.06
21	0.26	0.42	1.39	4.58	7.46
22	0.32	0.52	1.71	5.63	9.17
23	0.39	0.64	2.10	6.92	11.3
24	0.48	0.78	2.58	8.51	13.9
25	0.59	0.96	3.18	10.5	17.0
26	0.73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0.89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39.0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48.0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3.80	6.20	20.4	67.2	109.0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134.0
36	5.75	9.37	30.9	101.0	
37	7.07	11.5	37.9	124.0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		

Мальчики TS 3 и 4

Мальчики TS 3 и 4

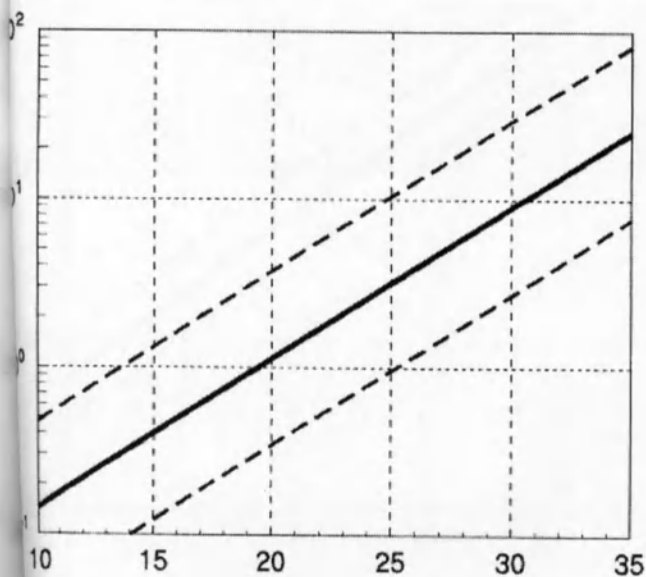


Рисунок 5. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Мальчики TS 3 и TS4 (см. текст).

Таблица 8. Девушки TS 5.

ИМТ (кг/м²)

Перцентиль (мкг/л)					
П (кг ²)	1	5	50	95	99
	0.50	0.66	1.34	2.71	3.62
	0.58	0.77	1.56	3.15	4.21
	0.67	0.89	1.81	3.67	4.89
	0.78	1.04	2.11	4.26	5.69
	0.91	1.21	2.45	4.96	6.62
	1.05	1.41	2.85	5.76	7.70
	1.22	1.64	3.31	6.70	8.95
	1.42	1.90	3.85	7.79	10.4
	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
	2.24	2.99	6.05	12.3	16.4
	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
	4.76	6.35	12.9	26.0	34.8
	5.53	7.39	15.0	30.3	40.4
	6.43	8.59	17.39	35.2	47.0
	7.48	9.99	20.2	40.9	54.7
	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
	13.7	18.3	37.0	74.9	99.9
	15.9	21.2	43.0	87.0	116.0
	18.5	24.7	50.0	101.0	135.0
	21.5	28.7	58.1	118.0	
	25.0	33.4	67.6	137.0	
	29.1	38.8	78.6		
	33.8	45.1	91.4		
	39.4	52.5	106.0		

Девушки TS 5 (< 20 лет)

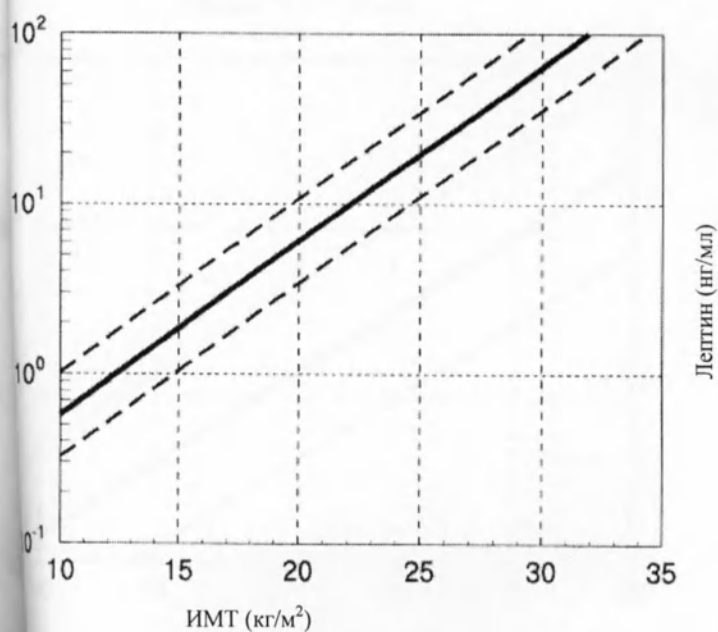


Рисунок 6. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Девушки TS 5 (см. текст).

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.16	0.47	0.73
12	0.04	0.06	0.18	0.54	0.84
13	0.05	0.07	0.21	0.62	0.97
14	0.05	0.08	0.24	0.72	1.12
15	0.06	0.10	0.28	0.84	1.30
16	0.07	0.11	0.33	0.97	1.51
17	0.08	0.13	0.38	1.12	1.74
18	0.1	0.15	0.44	1.3	2.02
19	0.11	0.17	0.51	1.50	2.34
20	0.13	0.2	0.59	1.74	2.7
21	0.15	0.23	0.68	2.01	3.13
22	0.17	0.27	0.79	2.33	3.62
23	0.20	0.31	0.91	2.69	4.19
24	0.23	0.36	1.05	3.12	4.85
25	0.27	0.41	1.22	3.61	5.62
26	0.31	0.48	1.41	4.17	6.5
27	0.36	0.55	1.63	4.83	7.52
28	0.41	0.64	1.89	5.59	8.71
29	0.48	0.74	2.19	6.47	10.1
30	0.55	0.86	2.54	7.49	11.7
31	0.64	1.00	2.94	8.67	13.5
32	0.74	1.15	3.4	10.0	15.6
33	0.86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0.99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3

Мальчики TS 3 и 4

Юноши TS 5 (< 20 лет)

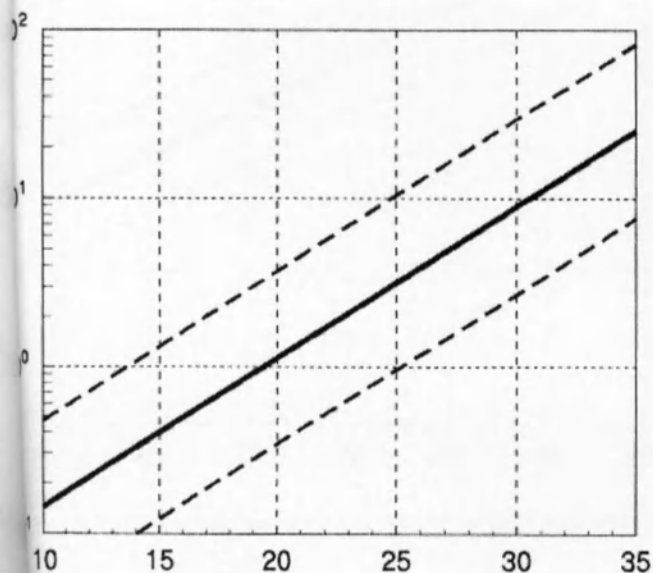


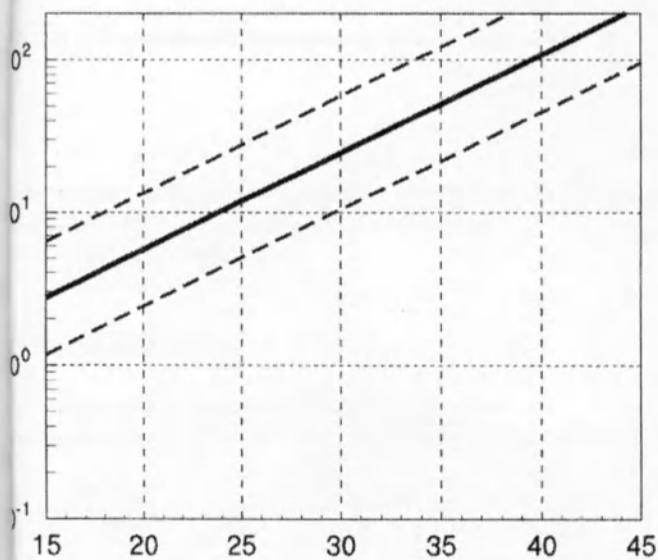
Рисунок 7. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Юноши TS 5 (см. текст).

Таблица 10. Женщины.

ИМТ (кг/м²)

Перцентиль (мкг/л)					
1	5	50	95	99	
0.46	0.65	1.53	3.59	5.10	
0.53	0.75	1.77	4.16	5.90	
0.61	0.87	2.05	4.82	6.83	
0.71	1.01	2.37	5.58	7.91	
0.82	1.17	2.75	6.46	9.17	
0.95	1.35	3.18	7.48	10.61	
1.10	1.57	3.68	8.66	12.3	
1.28	1.81	4.27	10.0	14.2	
1.48	2.10	4.94	11.6	16.5	
1.71	2.43	5.72	13.4	19.1	
1.99	2.82	6.62	15.6	22.1	
2.30	3.26	7.67	18.0	25.6	
2.66	3.78	8.88	20.9	29.3	
3.08	4.38	10.3	24.2	34.3	
3.57	5.07	11.9	28.0	39.7	
4.13	5.87	13.8	32.4	46.0	
4.79	6.79	16.0	37.5	53.3	
5.54	7.87	18.5	43.5	61.7	
6.42	9.11	21.4	50.4	71.5	
7.43	10.6	24.8	58.3	82.8	
8.61	12.2	28.7	67.5	95.8	
9.97	14.1	33.3	78.2	111.0	
11.5	16.4	38.5	90.5	129.0	
13.4	19.0	44.6	105.0	149.0	
15.5	22.0	51.6	121.0		
17.9	25.4	59.8	141.0		
20.8	29.5	69.3			
24.0	34.1	80.2			
27.8	39.5	92.9			
32.2	45.7	108.0			

Женщины (20-80 лет)



Мужчины (20-80 лет)

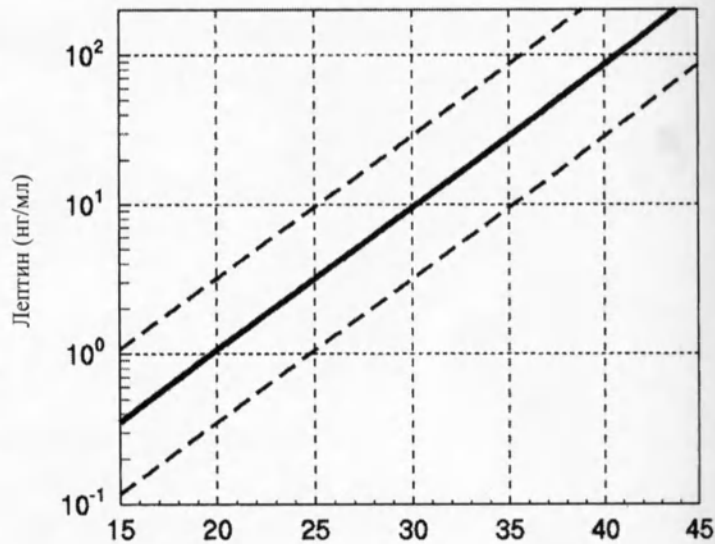


Рисунок 8. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Женщины (см. текст).

Таблица 11. Мужчины.

ИМТ (кг/м²)

Перцентиль (мкг/л)					
ИМТ (кг/м ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.15	0.44	0.69
12	0.04	0.06	0.18	0.55	0.87
13	0.05	0.08	0.23	0.69	1.08
14	0.06	0.09	0.28	0.85	1.34
15	0.07	0.12	0.35	1.06	1.67
16	0.09	0.15	0.44	1.33	2.09
17	0.12	0.18	0.55	1.65	2.60
18	0.14	0.23	0.68	2.06	3.24
19	0.18	0.28	0.85	2.57	4.04
20	0.22	0.35	1.06	3.20	5.03
21	0.23	0.44	1.32	3.98	6.27
22	0.35	0.54	1.64	4.97	7.81
23	0.43	0.78	2.05	6.19	9.73
24	0.54	0.85	2.55	7.71	12.1
25	0.67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0.83	1.31	3.96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7.67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36.0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3.89	6.12	18.5	55.8	87.8
34	4.85	7.63	23.0	69.6	109.0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136.0
36	7.53	11.8	35.8	108.0	
37	9.38	14.8	44.6	135.0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		

Рисунок 9. Референсные значения для уровня лептина в сыворотке крови в соотношении с ИМТ. Мужчины (см. текст).

По вопросам качества продукции обращаться по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, ЗАО «БиоХимМак»
т./факс (495) 647-2740 (многоканальный),
e-mail: info@biochemmack.ru

СОГЛАСОВАНО»

в. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, д.м.н., профессор

Юлтев В.В.



Всего прошито

и пронумеровано

14 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.

