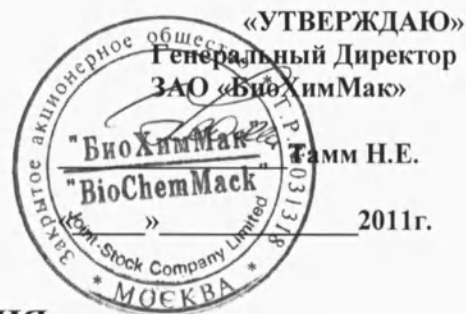


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения Гиалуроновой кислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (НА), также известная как гиалурат, гиалуронат или гиалуронан – это гликозаминогликан – высокомолекулярный полисахарид, с неразветвленной основной цепью, состоящей из чередующихся последовательностей β -(1-4)-глюкуроновой кислоты и β -(1-3)-N-ацетилглюкозаминовых компонентов. Каждый такой димер рассматривается как одна единица и имеет м.м. около 450 Да. Молекула НА может сильно варьировать по длине, от менее 10 до более, чем 1000 таких единиц¹⁻⁴. Гиалуроновая кислота в основном продуцируется фибробластами и другими специализированными клетками соединительной ткани. Она играет структурную роль в соединительнотканном матриксе (протеогликан) и участвует в различных межклеточных взаимодействиях. НА широко распространена по всему организму и может быть обнаружена в свободном виде в плазме или синовиальной жидкости.

В плазме время полужизни молекулы НА составляет около 5-6 минут^{3,4}. НА присутствует в высокой концентрации в синовиальной жидкости и отвечает за нормальное сохранение воды и смазывание сустава. Через лимфатическую систему НА синовиальной жидкости может переходить в плазму⁵. В кровотоке уровень НА поддерживается рецептор-зависимым механизмом удаления, присутствующим в синусоидальных эндотелиальных клетках печени и действием фермента гиалуронидазы^{6,7}.

Уровень НА в сыворотке может быть повышен при различных заболеваниях печени, характеризующихся фиброзом и циррозом печени, в результате снижения функции удаления НА печенью и/или из-за возрастания продукции НА в период воспаления печени^{8,9}. Было показано, что увеличение уровня НА лучше коррелирует со степенью гистологического повреждения печени, чем традиционный тест на функцию печени, включающий ALT/GOT (аланин аминотрансфераза/глутамин-оксалоацетат трансминаза), щелочную фосфатазу и билирубин^{10,11}. Было предположено, что определение сывороточного уровня НА может быть полезно для дифференциальной диагностики цирроза печени, для оценки степени фиброза печени, для мониторинга функции печени¹²⁻¹⁶. Было показано, что уровень НА отражает степень фиброза печени у пациентов с гепатитом С и серийные определения НА могут применяться для мониторинга лечения интерфероном альфа. Аналогичная корреляция получена для пациентов с алкогольным циррозом²⁰ и первичным билиарным циррозом¹⁰.

Уровень НА также является ранним маркером токсического повреждения печени такими веществами, как этанол, ацетаминофен, бактериальные липополисахариды, так как патологические изменения синусоидальных эндотелиальных клеток, происходящие под воздействием этих веществ, предшествуют патологическим изменениям гепатоцитов.

В данном наборе используется нативный белок, связывающий гиалуроновую кислоту (НАВР), полученный из хрящей быка, для специфического связывания НА в лунке и конъюгат фермент-НАВР, для выявления и измерения связавшегося НА.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест для определения гиалуроновой кислоты основан на методе твердофазного ферментного анализа, при котором для связывания НА используется белок, связывающий гиалуроновую кислоту (НАВР). В лунках микропланшета сорбирован НАВР. В ходе реакции в лунки микропланшета добавляются стандарты и образцы сыворотки или плазмы в соответствующем разведении. Во время первой инкубации НА, присутствующая в образцах, связывается с иммобилизованным в лунках НАВР.

После инкубации лунки промываются для удаления несвязавшихся молекул образцов. Затем в лунки добавляется раствор конъюгата НАВР-HRP, который образует комплекс со связавшейся в ходе первой инкубации НА. После второй инкубации следует промывка, в результате которой удаляется несвязавшийся конъюгат, после чего добавляется субстратный раствор – тетраметилбензидин и перекись водорода - который взаимодействует с ферментом с образованием цветного комплекса. Интенсивность окраски раствора измеряется в единицах оптической плотности (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Концентрация НА в образцах и контролях определяется путем интерполяции по калибровочной кривой, построенной по значениям, полученным для бланка (0 нг/мл) и НА стандартов, поставляемых в наборе (50, 100, 200, 500, 800 нг/мл).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Каждый набор содержит следующие компоненты (объемы могут меняться в зависимости от объема и конфигурации набора):

Реагент	Набор 96 тестов
Микропланшет, покрытый НАВР, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок	1 планшет
Реакционный Буфер (голубой раствор), 57 мл	1 флакон
Стандарты НА: 50 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 500 нг/мл, 800 нг/мл; По 0.5 мл во флаконе	5 флаконов
Буфер для разведения стандартов. Содержит 8 мМ азид натрия; 25 мл во флаконе	1 флакон
Конъюгат НАВР-пероксидаза (НАВР-HRP), (красный раствор), 13 мл во флаконе.	1 флакон
Однокомпонентный субстратный раствор (содержит тетраметилбензидин и перекись водорода, стабилизированный), 13 мл во флаконе	1 флакон
Стоп-раствор (0.36 N серная кислота), 15 мл во флаконе	1 флакон
Промывочный раствор, концентрат (33x фосфатный буфер (PBS)), 30 мл концентрата разводятся до 1 литра при этом получается 0.01 M PBS, pH7.35 ± 0.1	1 флакон

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики In Vitro.

1. С исследуемыми образцами сыворотки или плазмы пациентов, как и с любыми компонентами крови и биологическими материалами, надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом
2. Не пипетируйте ртом.
3. Не курите, не ешьте, не пейте в период использования набора или подготовки образцов.
4. Используйте одноразовые перчатки во время работы с реагентами или подготовки образцов. Мойте руки немедленно по окончании анализа.
5. Некоторые компоненты набора содержат 0.05% ProClin® в качестве консерванта. ProClin® является опасным веществом в концентрированном виде. Однако низкая концентрация ProClin®, использованная в данном наборе (0.05%), не считается опасной.
6. Однокомпонентный Субстратный Раствор может вызвать раздражение глаз и кожи. Возможна абсорбция через кожу. Используйте одноразовые перчатки во время работы с реагентом. Мойте руки немедленно после его использования. Держите реагент вдали от источников возгорания. Избегайте контакта с окислителями.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа рекомендуется использовать сыворотку или гепаринизированную плазму. Кровь должна быть собрана обычной венопункцией. Сыворотка или плазма должны быть отделены от клеток центрифугированием после образования сгустков.

Если образцы не будут исследоваться немедленно, то они должны храниться при температуре 2°C - 8°C, не более 72 часов. Для длительного хранения образцы должны быть заморожены при -20°C или ниже. Пробы, содержащие видимые частицы или сгустки, должны быть очищены центрифугированием перед использованием.

ИНСТРУКЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Поставляемые материалы: Набор для определения Гиалуриновой кислоты, см. раздел «РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА» данной инструкции.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Дистиллированная или деионизированная вода (приблизительно 1 литр) для приготовления буфера для промывки (промывочного раствора, PBS) и для установки «0» или blankирования на микропланшетном ридере в последнем шаге анализа.
2. Калиброванные стаканы и градуированные цилиндры разных размеров.
3. Калиброванные пипетки переменного объема с соответствующими одноразовыми наконечниками.
4. Различные стеклянные или полипропиленовые пробирки для работы с маленькими объемами.
5. Градуированные стакан, бутылъ или цилиндр на 1 литр.
6. Ручное или автоматическое промывающее устройство
7. 8-канальные пипетки (строго рекомендуется использовать).
8. Микропланшетный ридер с возможностью измерения оптической плотности при длине волны 450 нм (желательно использование фильтра сравнения 650 нм, если возможно)
9. Одноразовые перчатки (желательно, используемые без пудры)

ЗАМЕЧАНИЯ:

1. Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры ($18 - 26^{\circ}\text{C}$) перед использованием. Хорошо перемешайте реагенты и образцы перед началом работы, не допуская возникновения пены. Верните все неиспользованные реагенты и образцы в холодильник ($2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$) так быстро, как это возможно.

2. Рекомендуется все стандарты, контроли и образцы анализировать в дублях.

3. Зарезервируйте 2 лунки под реагентный бланк. Реакционный буфер (без образца), используемый в качестве реагентного бланка, служит точкой «0 нг/мл» для построения калибровочной кривой.

4. Одна лунка на каждом микропланшете при каждой постановке должна быть использована для бланка по воде. В эту лунку не добавляются ни образцы, ни реагенты набора. Вместо этого непосредственно перед считыванием ОП в лунку добавляется 200 мкл дистиллированной воды, аналогичной использованной для приготовления реагентов. Микропланшетный ридер должен быть запрограммирован на установку ноля или бланк по этой лунке.

5. Качество промывок сильно влияет на точность выполнения анализа. Наиболее качественной считается промывка, при которой струя промывочного раствора под давлением направлена из пластиковой сжимаемой бутылки через узкий наконечник на дно лунок микропланшета. Попадание промывочного раствора в лунку, предназначенную для бланка по воде не влияет на результаты анализа. Могут быть использованы автоматические промывающие устройства.

6. ВАЖНО: Недостаточно тщательное удаление остатков промывочного раствора может привести к неправильному развитию цветной реакции при добавлении Субстратного раствора.

7. Для получения достоверных результатов очень важно, чтобы время реакции во всех лунках было одинаковым. Рекомендуется использование 8-канальных пипеток там, где это возможно, это ускоряет процесс анализа и стандартизирует время внесения реагентов.

8. Необходимо точно соблюдать время инкубаций на каждом шаге процедуры. Для всех инкубаций время инкубации начинается с момента, когда соответствующий образец или реагент полностью добавлен.

9. Внесение реагентов или образцов должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью от лунки к лунке.

10. Не допускайте загрязнения реагентов при открытии или отборе аликвот из флаконов с исходными реагентами.

11. Не используйте Tween 20 или другие детергенты в этом анализе.

12. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.

13. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Промывочный раствор (PBS): Разведите 30 мл 33х концентрата промывочного раствора PBS до 1 литра дистиллированной водой. pH конечного раствора должен быть 7.35 ± 0.1 . Храните не используемый промывочный раствор при температуре $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$. Вылейте раствор, если заметите следы микробного или иного загрязнения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Стандарты НА и реагентный бланк необходимо анализировать в дублях. В дублях также рекомендуется анализировать и образцы. Реакционный буфер без добавления сыворотки используется в качестве реагентного бланка, который является стандартом 0 нг/мл НА. Реагентный бланк проходит все последующие процедуры также, как и остальные

стандарты и образцы. Бланк по воде должен быть включен в каждый микропланшет. Лунка, зарезервированная для бланка по воде, остается пустой до окончания всех инкубаций. 200 мкл дистиллированной воды добавляются по окончании всех процедур анализа, непосредственно перед считыванием ОП лунок микропланшета. Бланк по воде используется для установки ноля или бланкирования микропланшетного ридера.

2. Удалите стрипы, которые не будут использованы прямо сейчас, из рамки-держателя. Неиспользованные стрипы храните в пакете с осушителем.

3. Приготовьте стандарты НА и образцы. Для этого добавьте к 1 части каждого стандарта или образца 10 частей реакционного буфера (голубой раствор). Например, к 30 мкл образца необходимо добавить 300 мкл реакционного буфера, что даст объем, достаточный для проведения анализа данного образца в дубле.

4. Добавьте по 100 мкл каждого разведенного стандарта, образца и реакционного буфера (для реагентного бланка) в соответствующие лунки. Лунку для бланка по воде оставьте пустой.

5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре (18°C - 26°C).

6. После окончания инкубации аккуратно переверните микропланшет и вылейте содержимое в подходящий контейнер. Не позволяйте образцам попадать в другие лунки. Промойте лунки 4 раза промывочным раствором, полностью удаляя жидкость между промывками. Используйте резкие движения кисти для удаления жидкости из лунок. Попадание промывочного раствора в лунку, предназначенную для бланка по воде, не влияет на результаты анализа. Не позволяйте лункам высыхать!

7. Добавьте 100 мкл конъюгата НАВР-пероксидаза (красный раствор) в каждую лунку, за исключением бланка по воде.

8. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.

9. После окончания инкубации аккуратно переверните микропланшет и вылейте содержимое в подходящий контейнер. Промойте лунки 4 раза промывочным раствором, полностью удаляя жидкость между промывками, как это описано в п.6. Не позволяйте лункам высыхать!

10. Внесите по 100 мкл субстратного раствора во все лунки, за исключением бланка по воде, и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре. Добавляйте субстратный раствор с одинаковой скоростью. В положительных пробах должна развиваться голубая окраска.

11. Добавьте по 100 мкл стоп-раствора (0.36 N серная кислота) во все лунки, за исключением бланка по воде. Следите за тем, чтобы добавлять стоп-раствор в лунки в том же порядке и с той же скоростью, как в п.10. Не добавляйте стоп-раствор в лунку, зарезервированную для бланка по воде. Вместо стоп-раствора добавьте в эту лунку 200 мкл дистиллированной воды, аналогичной использованной для приготовления промывочного раствора.

12. Бланкируйте или обнулите микропланшетный ридер против лунки содержащей воду (бланк по воде). Считайте ОП каждой лунки при длине волны 450 нм (фильтр сравнения 650 нм). Определите оптическую плотность не позднее чем через час после внесения стоп-раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ:

1. Посчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение ОП для дублей для каждого стандарта, реагентного бланка и образцов.

2. Используя любой способ – 4-х параметрическую регрессию, линейную регрессию или построение вручную, рассчитайте наиболее подходящую кривую, используя средние значения ОП для 0 нг/мл (реагентный бланк) и стандартов 50 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 500 нг/мл, 800 нг/мл. Для каждого анализа должна быть рассчитана своя кривая. Исходя из этой

калибровочной кривой, построенной на 6 точках, рассчитайте значения концентраций НА (нг/мл) в образцах.

Пример калибровочной кривой:

(Эта калибровочная кривая не может быть использована для расчета результатов)

3. Все образцы с концентрацией, большей, чем у самого высокого стандарта (800 нг/мл), могут быть определены как «концентрация выше 800 нг/мл» или должны быть разбавлены и проанализированы еще раз. При этом умножайте значение полученной концентрации на коэффициент разведения.

4. Убедитесь, что выполнены все параметры контроля качества (см. «Контроль качества») перед тем, как сообщать результаты.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:

1. Среднее значение ОП для реagentного бланка должно быть ниже 0.100. Значения выше 0.100 могут указывать на загрязнение однокомпонентного субстратного раствора другими реагентами.

2. Среднее значение ОП для стандарта НА 500 нг/мл должно быть 0.800 или выше.

3. ОП дублей не должна отличаться больше, чем на 20%, для образцов со средним значением ОП 0.300 или более.

4. Каждая лаборатория периодически должна проверять дискриминационный уровень и нормальные значения для своей популяции. См. Характеристики анализа.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ²⁴:

Образцы сывороток 100 здоровых доноров (популяция А) были протестированы данным методом, наборами тремя различных лотов. Среднее значение НА для данной популяции составило 28.5 нг/мл, со стандартным отклонением 24.0 нг/мл. Нормальный дискриминационный уровень при 95% процентиле для нормальной популяции был установлен на 75 нг/мл. Таким образом,

Диапазон нормальных значений НА = 0 – 75 нг/мл
--

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ:

Клиническая специфичность: Здоровые люди

Образцы сыворотки, полученные от здоровых доноров, были анализированы данным методом для определения клинической специфичности теста. Вторая популяция (популяция В) из 100 образцов нормальной сыворотки и 180 образцов сыворотки, полученной от здоровых доноров, была анализирована данным методом. В образцах была определена концентрация НА. По отношению к установленному диапазону нормальных значений (до 75 нг/мл), для 9 из 280 сывороток был получен позитивный результат, что в целом дает клиническую специфичность теста 96.8%

Клиническая чувствительность: Заболевания печени (цирроз)

62 образца сывороток полученных у пациентов с клинически подтвержденными заболеваниями печени были анализированы данным методом для определения клинической чувствительности данного теста²⁵: 49 пациентов с диагностированным циррозом (в основном алкогольным) и 13 пациентов, подвергшихся детоксификации, находящихся на лечении от алкогольной зависимости, но без каких-либо клинических или лабораторных данных о повреждении печени. В таблице приведены сравнительные данные для образцов с

концентрацией НА > 100 нг/мл для этих двух групп и группы здоровых доноров, взятой в качестве контрольной:

Образцы	N	Среднее значение НА, нг/мл	% положительных значений
Подтвержденный Цирроз	49	371.6	38/49 = 77.6%
Детоксификация	13	51.4	2/13 = 15.4%
Здоровые доноры	100	19.8	0/100 = 0%

Средние значения концентрации НА в сыворотке для больных с циррозом и пациентов, находящихся на лечении от алкогольной зависимости, достоверно отличались от среднего значения концентрации НА в контрольной группы здоровых доноров ($p < 0.001$)

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Чувствительность анализа

Минимально определяемая концентрация НА, которую возможно достоверно измерить с помощью данного метода, составляет 10 нг/мл.

См. раздел «Ожидаемые значения».

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость данного набора была определена внутри одной серии (16 определений) и между сериями исследований (3 серии по 16 определений каждая), с использованием наборов различных лотов.

Значения коэффициентов вариации (CV%) приведены в таблице:

Концентрация НА в пробе, нг/мл	CV% внутри одной серии	CV% между сериями
100 нг/мл	4.7%	7.0%
200 нг/мл	3.6%	5.7%
400 нг/мл	4.2%	6.2%

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

ИЗВЛЕЧЕНИЕ в данном методе определялось тестированием 11 проб с известной концентрацией НА тремя наборами из различных лотов. Были приготовлены и протестированы в дублях два ряда разведений. Процент (%) извлечения рассчитывали как отношение среднего значения концентрации НА, полученного при анализе, к известной (ожидаемой) концентрации. Результаты, полученные для трех лотов, приведены в таблице:

НА лот №1			НА лот №2		НА лот №3	
№ пробы	Ожидаемое значение	Средний % извлечения	Ожидаемое значение	Средний % извлечения	Ожидаемое значение	Средний % извлечения
1	600/0	102.1%	600/0	102.0%	600/0	97.7%
2	400/0	99.5%	400/0	100.3%	400/0	98.7%
3	292.2	106.4%	313.3	100.6%	314.9	101.0%
4	250.0	100.3%	250.0	99.2%	250.0	102.3%
5	211.3	107.5%	224.2	99.5%	224.6	102.3%

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.

