

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»

Тамм Н.Е.

«_____» _____ 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения Ethanolamin IgG/IgM

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Ethanolamin-GM предназначен для отдельного количественного и качественного определения IgG и/или IgM антител к фосфатидилэтаноламину в человеческой сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием высокочистого этаноламина и нативного человеческого β 2-гликопротеина I.

Эти антитела распознают специфические эпитопы комплекса, образованного фосфатидилэтаноламином и β 2-гликопротеином I. Метод предназначен для диагностики и оценки риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом (APS).

2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Антитела к фосфатидилэтаноламину, фосфолипиду, глицерола, относятся к группе антифосфолипидных антител, направленных к таким фосфолипидам, как кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, сфингомиелин и фосфатидиловая кислота. Фосфолипиды являются компонентами биологических мембран.

Антифосфолипидные антитела часто выявляются в сыворотке пациентов с системной красной волчанкой (SLE) и подобными заболеваниями. Присутствие антифосфолипидных антител у пациентов с SLE и другими подобными заболеваниями типично для вторичного антифосфолипидного синдрома (APS). И наоборот, присутствие антифосфолипидных антител у больных, не страдающих другими аутоиммунными заболеваниями свидетельствует о первичном APS.

Многие исследования показали наличие корреляции между этими антителами и повышенной встречаемостью тромбоза, тромбоцитопении и привычных выкидышей (в результате инфаркта плаценты). Точные механизмы по которым патогенные антифосфолипидные антитела индуцируют развитие тромбоза пока точно не установлены.

Неоднократно в литературе появлялись данные о том, что антитела к фосфатидилэтаноламину обладают схожими или идентичными патогенными свойствами с антителами к фосфатидилсерину или кардиолипину. PE является цвиттер-ионным фосфолипидом, присутствующим и на внутренней, и на внешней стороне клеточной мембраны, и предполагается, что его участие в развитии тромбоза связано с его ролью в метаболизме протеина C и инактивации фактора Va активированным протеином C.

Антитела к PE могут играть важную роль в патогенезе APS, ингибируя активированный протеин C. В некоторых случаях анти-PE антитела являются единственными выявляемыми антифосфолипидными антителами, таким образом их определение является важным диагностическим инструментом в дополнение к определению антител к кардиолипину.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сывороток разводят в 101 раз и инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном. Антитела, присутствующие в образцах сывороток пациентов, связываются с антигеном. Не связавшаяся фракция удаляется при последующей промывке. Вслед за промывкой в лунки добавляется конъюгат антител к иммуноглобулинам человека и пероксидазы хрена (конъюгат), который при дальнейшей инкубации взаимодействует с образовавшимся комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Не связавшийся конъюгат удаляется при последующей промывке.

Добавление субстрата ТМВ вызывает развитие ферментативной цветной (голубое окрашивание) реакции, которая останавливается добавлением разведенной кислоты (окраска меняется на желтую). Интенсивность окрашивания зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-

антитело в лунках микропланшета, и, таким образом, пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образцах сывороток пациентов.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов
5x Буфер для образцов 20 мл концентрата (5x) (белая крышка: желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
50x Буфер для промывок 20 мл концентрата (50x) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: бесцветный раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарт Cut-off 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгаты 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) 15 мл IgM (зеленая крышка: зеленый раствор) Содержат: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	По 1 флакону
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12x8ми луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклопосуда (цилиндр 100 – 1000 мл), пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл), многоканальные пипетки (100 – 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C/35-46°F, в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и

Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

5.1 Опасность для здоровья

Данный продукт предназначен только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. Только сотрудники, специально обученные методам диагностики in vitro, могут выполнять тестирование данным методом. Хотя данный продукт не считается чрезвычайно токсичным или опасным при условии правильного использования, соблюдайте следующие рекомендации для наибольшей безопасности:

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. ВНИМАНИЕ! Стандарты, контроли и буферы содержат азид натрия (NaN₃) в качестве консерванта. NaN₃ может быть токсичен при проглатывании или попадании на кожу или в глаза. NaN₃ может вступать в реакцию с медью и свинцом водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металла. При утилизации проливайте большим количеством воды для предотвращения накопления азидов металлов. Пожалуйста, выполняйте утилизацию в соответствии с CDC или другими локальными/национальными руководствами.

- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры (20-32°C/68-89.6°F) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: При использовании автоматических систем рекомендуется использовать температуру инкубации 30°C/86°F.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше 37°C/ 98,6 °F.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.
- Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований.

Не используйте желтушную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на низкой скорости (<1000 x g). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки.

После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при 2-8°C/35-46°F до трех дней, или должны быть заморожены при -20°C/-4°F для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовления перед пипетированием

Разведите концентрированные реагенты:

Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).

Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).

Образцы

Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1х), например, 1000 мкл буфера для образцов (1х) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1х) на 8 лунок или 200 мл для промывки 96 лунок. Например, 4 мл концентрата буфера для промывок плюс 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Рассчитайте избыточный объем, требуемый для установки инструмента и «мертвый» объем для автоматического пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите полностью жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще два раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, требуемое для текущего анализа. Удалите лишние лунки из держателя, поместите их в поставляемый пластиковый пакет с осушителем, тщательно закройте его и храните при 2-8°C/35-46°F

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Схема пипетирования приведена в приложении А, процедура теста описана в приложении В. Все образцы и стандарты рекомендуется анализировать в дублях. Стандарт Cut-off необходимо анализировать только при выполнении качественного анализа.

ЗАМЕЧАНИЕ: При параллельном определении IgG и IgM, все стандарты, контроли и образцы должны анализироваться дважды, отдельно для каждого класса иммуноглобулинов.

1. Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца сыворотки пациента в предназначенные для образцов лунки.
2. Внесите по 100 мкл стандартов ИЛИ контроля «cut-off» и отрицательного и положительного контролей в соответствующие лунки.
3. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
4. Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
5. Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую лунку.
6. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
7. Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
8. Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.
9. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F), в темноте.
10. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор субстрата.
11. Инкубируйте не менее 5 минут.
12. Аккуратно перемешайте микропланшет в течение 5 секунд.
13. Считайте абсорбцию при 450 нм (опционально при 450/620 нм) в течение 30 минут

8. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для количественной оценки постройте калибровочную кривую, откладывая оптическую плотность (ОП) каждого калибратора (по оси у) против соответствующих значений концентраций в Ед/мл (по оси х). Для получения наиболее качественных результатов рекомендуется использовать log/in координаты и 4хпараметрическую аппроксимацию. Считайте концентрацию антител, выраженную в Ед/мл, используя ОП, полученную для каждого образца.

Нормальный диапазон	Сомнительные результаты	Положительные результаты
< 12 Ед/мл	12-18 Ед/мл	>18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется пипетировать в дублях при каждой постановке.

Стандарты	ОП 450/620	CV %
IgG/M	нм	(отклонения)
0 Ед/мл	0.039	3.2
3 Ед/мл	0.172	5.4
10 Ед/мл	0.330	3.2
30 Ед/мл	0.663	0.6
100 Ед/мл	1.302	2.0
300 Ед/мл	2.115	0.6

Пример расчетов:

Пациент	Дубли (ОП)	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P01	0.917/0.910	0.914	52.0
P02	0.443/0.454	0.449	15.8

Специфические для лота данные приведены в прилагаемом к набору листе контроля качества. Медицинские лаборатории могут проводить внутренний контроль качества, используя свои собственные контроли и/или приготовленные в лаборатории пулы сывороток, как предусмотрено руководством EU. Не используйте данный пример для расчета результатов тестирования образцов сывороток пациентов!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на использовании собственной технологии, контролях, оборудовании и популяции, согласно собственным установленным процедурам.

Для качественного определения считайте ОП образцов и контроля «cut-off». Сравните ОП, полученную для образцов сывороток пациентов, и ОП контроля «cut-off». При интерпретации качественного анализа рекомендуется считать сомнительными результаты, попадающие в диапазон $\pm 20\%$ от значения стандарта cut-off. Все образцы, ОП которых выше данного диапазона, являются положительными, а все образцы, ОП которых ниже данного диапазона, являются отрицательными.

Отрицательный: ОП пациента $< 0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Сомнительный: $0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»} < \text{ОП пациента} < 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Положительный: ОП пациента $> 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Материал образца: сыворотка
- Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым буфером для образцов
- Общее время инкубации: 90 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F)
- Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- Хранение: при 2-8°C/35-46°F, только в оригинальных флаконах
- Количество определений: 96 определений

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Аналитическая чувствительность

Тестирование буфера для образцов данным методом 30 раз показало аналитическую чувствительность метода 1.0 Ед/мл

10.2 Специфичность и чувствительность

Микропланшет покрыт высокочистым этаноламином и нативным человеческим β 2-гликопротеином I. Не выявлено перекрестной реактивности с другими аутоантигенами. Данные были получены с помощью набора Ethanolamin-GM (кат №RE70581)

Корреляция

Сравнимость результатов анализа оценивали тестируя более 30 образцов данным методом и другим коммерчески доступным ИФА методом. Линейный регрессионный анализ результатов, полученных с помощью двух методов показал, что они эквивалентны. Данные доступны по запросу.

10.3 Линейность

Образцы сывороток были протестированы данным методом и была показана линейность разведения. Однако из-за гетерогенной природы человеческих аутоантител могут встречаться образцы, которые не подчиняются этому правилу.

№ образ	Коэф. разведе	Изменен ная	Ожидаем ая	извлечен ие (%)
1	1/100	123.0	125.0	98.4
	1/200	61.3	62.5	98.1
	1/400	29.7	31.3	94.9
	1/800	15.2	15.6	97.4
2	1/100	81.4	80.0	101.8
	1/200	42.8	40.0	107.0
	1/400	21.4	20.0	107.0
	1/800	9.8	10.0	98.0

10.4 Точность и воспроизводимость

Для определения воспроизводимости метода, внутри серии и между сериями, были протестированы три образца сывороток с концентрациями в диапазоне калибровочной кривой.

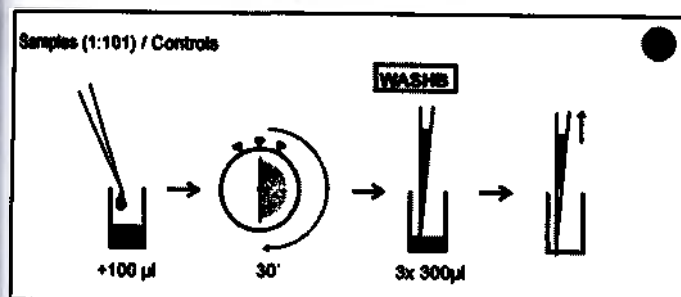
внутри серии		
№ образ	Средн	CV (%)
1	132.0	5.3
2	84.0	3.7
3	35.0	2.5

между сериями		
№ образ	Средн	CV (%)
1	128.0	4.8
2	82.0	3.3
3	33.0	2.7

10.5 Калибровка

Из-за отсутствия международных референсных стандартов данный метод прокалиброван в условных единицах (Ед/мл).

Приложение А: Схема пипетирования



Рекомендуется пипетировать стандарты, контроли и образцы следующим образом:
Для количественной оценки используйте стандарты для построения калибровочной кривой.

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off».

Для количественной оценки используйте стандарты для						
	1	2	3	4	5	6
A	CalA	CalE	P1			
B	CalA	CalE	P1			
C	CalB	CalF	P2			
D	CalB	CalF	P2			
E	CalC	PC	P3			
F	CalC	PC	P3			
G	CalD	NC				
H	CalD	NC				

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off»						
	7	8	9	10	11	12
A	NC	P2				
B	NC	P2				
C	CC	P3				
D	CC	P3				
E	PC					
F	PC					
G	P1					
H	P1					

CalA: стандарт A,

CalB: стандарт B,

CalC: стандарт C,

CalD: стандарт D,

CalE: стандарт E,

CalF: стандарт F

PC: положительный контроль

NC: отрицательный контроль

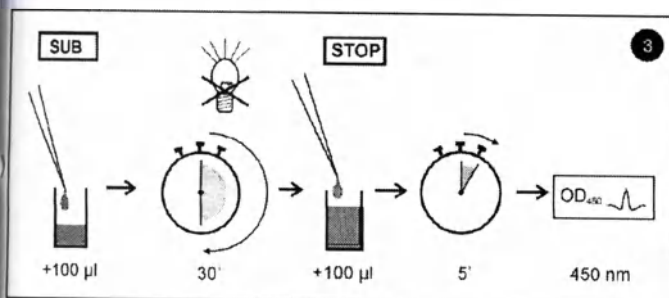
CC: стандарт «Cut-off»

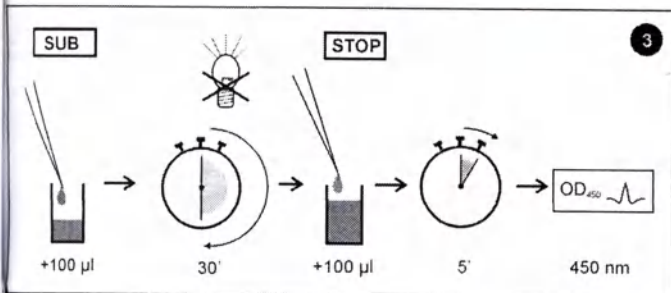
P1: образец сыворотки 1-го пациента

P2: образец сыворотки 2-го пациента

P3: образец сыворотки 3-го пациента

Приложение В: Процедура анализа





«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

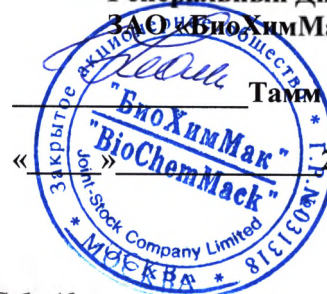
8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения LC-1-Ab.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор LC-1 предназначен для количественного и качественного определения аутоантител I типа к цитозольному печеночному антигену (анти-LC-1) в человеческой сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием человеческой рекомбинантной формиминотрансферазы циклодеаминазы (цитозольного печеночного антигена).
Данный набор предназначен для диагностики аутоиммунных гепатитов (АИГ).

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Аутоиммунный гепатит (АИГ) это хроническое прогрессирующее заболевание печени известного происхождения, которое хорошо отвечает на иммуносупрессивную терапию, но имеет очень плохой прогноз при отсутствии лечения. Ранняя и точная диагностика этого заболевания очень важна. Для АИГ характерны гистологические признаки перипортального воспаления в отсутствие вирусных маркеров, гипергаммаглобулинемия, и, у большинства пациентов, присутствие аутоантител в сыворотке. Анти-ядерные антитела (ANA), антитела к гладким мышцам (SMA), антитела к микросомам печени и почек (LKM) и антитела к растворимому антигену печени (SLA) являются маркерами АИГ. 70% пациентов АИГ положительны при тестировании на ANA и/или SMA, 20% положительные на SLA, 10% положительные на LKM-1. Эти антитела имеют диагностическую значимость при АИГ, но только антитела к SLA высокоспецифичны для АИГ. ANA/SMA также присутствуют у 10-15% пациентов с вирусными гепатитами и другими аутоиммунными заболеваниями. LKM-1 также ассоциированы с аутоиммунным гепатитом С.

Анти-LKM-1 реже ассоциированы с АИГ, чем ANA/SMA/SLA, и преимущественно встречается у детей в возрасте от 2 до 14 лет. Обычно у них наблюдается острое проявление с быстрой прогрессией развитием цирроза и печеночной недостаточности.

Показано, что аутоантитела I типа к цитозольному печеночному антигену ассоциированы с анти-LC-1 аутоантителами у 30% пациентов при LKM-1 положительном АИГ. В 10% случаев анти-LC-1 антитела являются единственными печеночными циркулирующими аутоантителами. Антиген, распознаваемый анти-LC1, идентифицирован как специфический метаболический фермент печени с молекулярной массой 58 кДа, и назван формиминотрансфераза циклодеаминаза (FTCD). FTCD это бифункциональный белок, состоящий из различных глобулярных FT и CD доменов, связанных коротким линкером. Реактивность анти-LC-1 аутоантител направлена к различным регионам молекулы FTCD, в основном к эпитопам FT региона, чувствительным к конформации.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сывороток разводят в 101 раз и инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном. Антитела, присутствующие в образцах сывороток пациентов, связываются с антигеном. Не связавшаяся фракция удаляется при последующей промывке. Вслед за промывкой в лунки добавляется конъюгат антител к иммуноглобулинам человека и пероксидазы хрена (конъюгат), который при дальнейшей инкубации взаимодействует с образовавшимся комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Не связавшийся конъюгат удаляется при последующей промывке.

Добавление субстрата ТМВ вызывает колориметрическую (голубое окрашивание) реакцию, которая останавливается добавлением разведенной кислоты (окраска меняется на желтую). Интенсивность образования окрашивания из хромогена зависит от количества конъюгата, связавшегося

с комплексом антиген-антитело в лунках микропланшета, и, таким образом, пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образцах сывороток пациентов.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов
5x Буфер для образцов 20 мл концентрата (5x) (белая крышка: желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
50x Буфер для промывок 20 мл концентрата (50x) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Cut-off контроль 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгат 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) Содержит: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	1 флакон
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12x8ми луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклопосуда (цилиндр 100 – 1000 мл), пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл), многоканальные пипетки (100 – 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C/35-46°F, в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

5.1 Опасность для здоровья

Данный продукт предназначен только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. Только сотрудники, специально обученные методам диагностики in vitro, могут выполнять тестирование данным методом. Хотя данный продукт не считается чрезвычайно токсичным или опасным при условии правильного использования, соблюдайте следующие рекомендации для наибольшей безопасности:

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. ВНИМАНИЕ! Стандарты, контроли и буферы содержат азид натрия (NaN₃) в качестве консерванта. NaN₃ может быть токсичен при проглатывании или попадании на кожу или в глаза. NaN₃ может вступать в реакцию с медью и свинцом водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металла. При утилизации проливайте большим количеством воды для предотвращения накопления азидов металлов. Пожалуйста, выполняйте утилизацию в соответствии с CDC или другими локальными/национальными руководствами.

Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ. Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры (20-32°C/68-89.6°F) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: При использовании автоматических систем рекомендуется использовать температуру инкубации 30°C/86°F.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше 37°C/ 98,6 °F.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.
- Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований. Не используйте желтушную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на

низкой скорости ($<1000 \times g$). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки. После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при $2-8^{\circ}\text{C}/35-46^{\circ}\text{F}$ до трех дней, или должны быть заморожены при $-20^{\circ}\text{C}/-4^{\circ}\text{F}$ для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовления перед пипетированием

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).
- Образцы
- Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1х), например, 1000 мкл буфера для образцов (1х) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1х) на 8 лунок или 200 мл для промывки 96 лунок. Например, 4 мл концентрата буфера для промывок плюс 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Рассчитайте избыточный объем, требуемый для установки инструмента и «мертвый» объем для автоматического пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите полностью жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще два раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, требуемое для текущего анализа. Удалите лишние лунки из держателя, поместите их в поставляемый пластиковый пакет с осушителем, тщательно закройте его и храните при $2-8^{\circ}\text{C}/35-46^{\circ}\text{F}$

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Схема пипетирования приведена в приложении А, процедура теста описана в приложении В. Все образцы и стандарты рекомендуется анализировать в дублях. Стандарт Cut-off необходимо анализировать только при выполнении качественного анализа.

- Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца сыворотки пациента в предназначенные для образцов лунки.
- Внесите по 100 мкл стандартов ИЛИ контроля «cut-off» и отрицательного и положительного контролей в соответствующие лунки.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре ($20-32^{\circ}\text{C}/68-89.6^{\circ}\text{F}$).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
- Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре ($20-32^{\circ}\text{C}/68-89.6^{\circ}\text{F}$).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
- Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре ($20-32^{\circ}\text{C}/68-89.6^{\circ}\text{F}$), в темноте.
- Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор субстрата.
- Инкубируйте не менее 5 минут.
- Аккуратно перемешайте микропланшет в течение 5 секунд.
- Считайте абсорбцию при 450 нм (опционально при 450/620 нм) в течение 30 минут

8. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для количественной оценки постройте калибровочную кривую, откладывая оптическую плотность (ОП) каждого калибратора (по оси у) против соответствующих значений концентраций в Ед/мл (по оси х). Для получения более качественных результатов рекомендуется использовать log/lin координаты и 4хпараметрическую аппроксимацию. Считайте концентрацию антител, выраженную в Ед/мл, используя ОП, полученную для каждого образца.

Нормальный диапазон	Сомнительные результаты	Положительные результаты
< 12 Ед/мл	12-18 Ед/мл	> 18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется пипетировать в дублях при каждой постановке.

Стандарты IgG	ОП 450/620 нм	CV % (отклонения)
0 Ед/мл	0.046	2.4
3 Ед/мл	0.171	2.6
10 Ед/мл	0.372	1.0
30 Ед/мл	0.698	3.8
100 Ед/мл	1.456	0.4
300 Ед/мл	2.396	2.0

Пример расчетов:

Пациент	Дубли (ОП)	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P01	1.254/1.208	1.231	74.4
P02	0.658/0.644	0.651	25.8

Специфические для лота данные приведены в прилагаемом к набору листе контроля качества. Медицинские лаборатории могут проводить внутренний контроль качества, используя свои собственные контроли и/или приготовленные в лаборатории пулы сывороток, как предусмотрено руководством EU. Не используйте данный пример для расчета результатов тестирования образцов сывороток пациентов!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на использовании собственной технологии, контролях, оборудовании и популяции, согласно собственным установленным процедурам.

Для качественного определения считайте ОП образцов и контроля «cut-off». Сравните ОП, полученную для образцов сывороток пациентов, и ОП контроля «cut-off». При интерпретации качественного анализа рекомендуется считать сомнительными результаты, попадающие в диапазон $\pm 20\%$ от значения стандарта cut-off. Все образцы, ОП которых выше данного диапазона, являются положительными, а все образцы, ОП которых ниже данного диапазона, являются отрицательными.

Отрицательный: ОП пациента $< 0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Сомнительный: $0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»} < \text{ОП пациента} < 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Положительный: ОП пациента $> 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Материал образца: сыворотка
- Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым буфером для образцов
- Общее время инкубации: 90 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F)
- Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- Хранение: при 2-8°C/35-46°F, только в оригинальных флаконах
- Количество определений: 96 определений

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Аналитическая чувствительность

Тестирование буфера для образцов данным методом 30 раз показало аналитическую чувствительность метода 1.0 Ед/мл

10.2 Специфичность и чувствительность

Микропланшет покрыт человеческой рекомбинантной формиминотрансферазной циклодеаминазой. Не выявлено перекрестной реактивности с другими аутоантителами. Метод показал диагностическую специфичность 99%. Диагностическая чувствительность данного метода для LKM-положительных аутоиммунных гепатитов (АИГ-2) составляет 48%. Данные были получены с помощью данного набора LC-1 (кат №RE70901)

Корреляция

Сравнимость результатов анализа оценивали, тестируя более 30 образцов данным методом и другим коммерчески доступным ИФА методом. Линейный регрессионный анализ результатов, полученных с помощью двух методов показал, что они эквивалентны. Данные доступны по запросу.

10.3 Линейность

Образцы сывороток были протестированы данным методом и была показана линейность разведения. Однако из-за гетерогенной природы человеческих аутоантител могут встречаться образцы, которые не подчиняются этому правилу.

№ образ	Козф. разведе	Изменен ная	Ожидаем ая	извлечен ие (%)
1	1/100	134.8	135.0	99.8
	1/200	66.3	67.5	98.2
	1/400	32.8	33.8	97.0
	1/800	15.8	16.9	93.5
2	1/100	98.5	100.0	98.5
	1/200	51.2	50.0	102.4
	1/400	25.3	25.0	101.2
	1/800	11.5	12.5	92.0

10.4 Точность и воспроизводимость

Для определения воспроизводимости метода, внутри серии и между сериями были протестированы три образца сывороток с концентрациями в диапазоне калибровочной кривой.

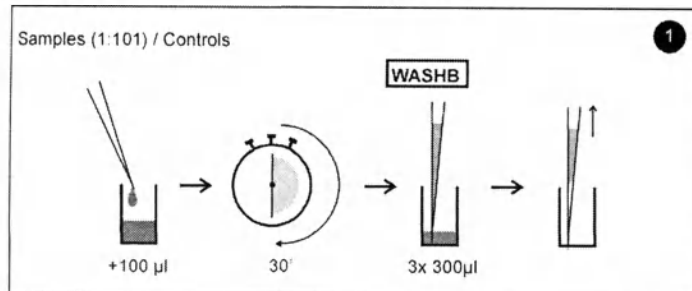
ВНУТРИ СЕРИИ		
№ образ	Средн	CV
		(%)
1	143.0	3.2
2	83.0	4.1
3	19.0	3.8

МЕЖДУ СЕРИЯМИ		
№ образ	Средн	CV
		(%)
1	141.0	2.8
2	85.0	4.2
3	23.0	5.1

10.5 Калибровка

Из-за отсутствия международных референсных стандартов данный метод прокалиброван в произвольно выбранных единицах (Ед/мл).

Приложение А: Схема пипетирования



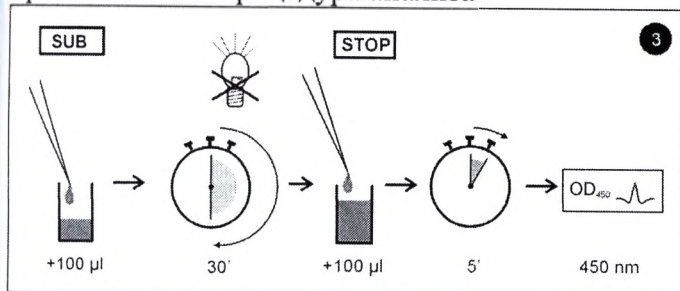
Рекомендуется пипетировать стандарты, контроли и образцы следующим образом:
 Для количественной оценки используйте стандарты для построения калибровочной кривой.
 Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off».

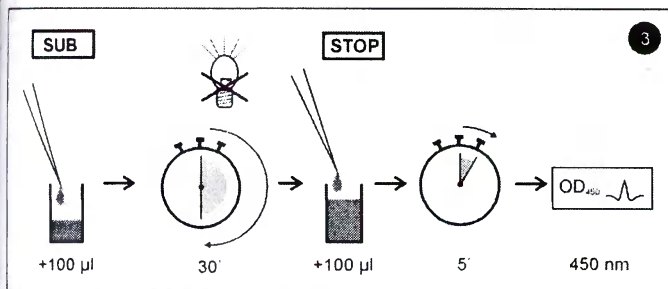
Для количественной оценки используйте стандарты для						
	1	2	3	4	5	6
A	CalA	CalE	P1			
B	CalA	CalE	P1			
C	CalB	CalF	P2			
D	CalB	CalF	P2			
E	CalC	PC	P3			
F	CalC	PC	P3			
G	CalD	NC				
H	CalD	NC				

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off»						
	7	8	9	10	11	12
A	NC	P2				
B	NC	P2				
C	CC	P3				
D	CC	P3				
E	PC					
F	PC					
G	P1					
H	P1					

- CalA: стандарт A,
- CalB: стандарт B,
- CalC: стандарт C,
- CalD: стандарт D,
- CalE: стандарт E,
- CalF: стандарт F
- PC: положительный контроль
- NC: отрицательный контроль
- CC: стандарт «Cut-off»
- P1: образец сыворотки 1-го пациента
- P2: образец сыворотки 2-го пациента
- P3: образец сыворотки 3-го пациента

Приложение В: Процедура анализа





«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения *Serine-Prothrombin-Ab IgG/IgM*.

Иммуноферментный набор для количественного и качественного определения IgG и/или IgM антител к фосфатидилсерину и протромбину в человеческой сыворотке.

Назначение

Данный набор предназначен для количественного определения и качественного определения IgG и/или IgM антител к фосфатидил-серину и протромбину в человеческой сыворотке. Набор может быть использован с целью диагностики и оценки риска тромбоза у больных системной красной волчанкой или антифосфолипидным синдромом (APS, АФС).

1. Введение

Антитела к протромбину и фосфатидилсерину, кислому фосфолипиду, производному глицерина, принадлежат к группе анти-фосфолипидных антител, специфических к таким фосфолипидам, как кардиолипин, фосфатидил -инозитол, -этаноламин, -холин, сфингомиелин, фосфатидная кислота и протромбин. Фосфолипиды являются компонентами биологических мембран. Протромбин (человеческий фактор II) – это плазменный проэнзим с молекулярной массой 72 кДа. Он соединяется с активированными формами фактора V, фактора X и фосфолипидами, с образованием каталитического комплекса, известного как протромбиназный комплекс. В присутствии ионов кальция, комплекс расщепляет мембраноассоциированный протромбин до тромбина, который затем высвобождается в растворимую фазу.

Анти-фосфолипидные антитела часто выявляют в сыворотке больных с системной красной волчанкой (СКВ, SLE) и подобными заболеваниями. Встречаемость анти-фосфолипидных антител у больных с SLE и подобными заболеваниями типично при вторичном антифосфолипидном синдроме (АФС, APS). И наоборот, антифосфолипидные антитела у больных без других аутоиммунных заболеваний, характерны для первичного APS.

Во многих исследованиях показана корреляция между наличием этих антител и повышенной частотой тромбозов, тромбоцитопений и привычной невынашиваемости (как следствия инфаркта плаценты).

Точные механизмы индукции тромбоза патогенными антифосфолипидными антителами до конца неясны.

Недавно было показано, что антитела к самому протромбину в значительной степени ассоциированы с потерей плода при АФС. Антитела к протромбину являются первым маркером этого серьезного осложнения, так как все другие известные антифосфолипидные антитела слабо коррелируют с потерей плода.

Кроме того, антитела к комплексу протромбина и фосфатидилсерина ассоциированы с второй основной группой клинической манифестации АФС, венозным и артериальным тромбозом. Однако они не коррелируют с потерей плода.

Таким образом, оба типа антител служат важным диагностическим инструментом в дифференциальной диагностики гетерогенных манифестаций АФС.

2. Принцип метода

Образцы, разведенные 1:101 инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном. Если в образцах присутствуют антитела, то они связываются с антигеном.

Несвязавшуюся фракцию удаляют промывкой. Затем в лунки вносят антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена (конъюгат), которые взаимодействуют с комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Несвязавшийся конъюгат удаляется при промывке.

После добавления субстратного раствора развивается цветная реакция (голубое окрашивание), которую останавливают кислым стоп-раствором (окрашивание меняется на желтое). Интенсивность развившегося окрашивания зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-антитело, и пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образце.

3. Поставляемые реагенты:

Количество	Компонент
Должны быть разведены:	
1 x 20 мл	Буфер для разведения образцов, концентрат 5x (белая крышка, желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия (консервант)
1 x 20 мл	Буфер для промывок, концентрат 50x (белая крышка, зеленый раствор). Содержит: Tris, NaCl, Tween, азид натрия (консервант)
Готовы к использованию:	
1 x 1.5 мл	Отрицательный контроль (зеленая крышка, желтый раствор) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия (консервант)
1 x 1.5 мл	Положительный контроль (красная крышка, желтый раствор) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия (консервант)
6 x 1.5 мл	Стандарты 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (желтый раствор: интенсивность увеличивается с увеличением концентрации) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия (консервант)
1 x 15 мл	Ферментный конъюгат, IgG (голубая крышка, голубой раствор), содержит: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена
1 x 15 мл	Ферментный конъюгат, IgM (зеленая крышка, зеленый раствор), содержит: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена
1 x 15 мл	Субстратный раствор ТМВ (черная крышка) Содержит стабилизированный раствор ТМВ/ H ₂ O ₂ .
1 x 15 мл	Стоп-раствор. (белая крышка, бесцветный раствор) Содержит 1 М соляную кислоту
1 x 12x8	Микропланшет. 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов, покрытых см. раздел 1.

МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450 нм (длина волны сравнения 620 нм, 600-690 нм)
- Стеклопосуда, пробирки для разведения образцов
- Вортекс

- Микропипетки для внесения объемов 10; 100; 200; 500; 1000 мкл
- Автоматическое или полуавтоматическое промывающее устройство, емкость для буфера для промывок
- Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер.
- Данный метод разработан для использования с очищенной водой, согласно определению Фармакопеи США (USP 26 - NF 21) и Европейской Фармакопеи (Eur.Ph. 4th ed.).

4. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты и микропланшет должны храниться при температуре 2-8°C, в оригинальных контейнерах.

После приготовления растворы стабильны в течение 1 месяца при 4°C. Реагенты и микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте.

Избегайте попадания света на раствор ТМВ. Храните микропланшет в оригинальном тщательно закрытом пакете, с осушителем.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1 Безопасность здоровья

Набор – только для диагностики *in vitro*. Для использования специалистами. Хотя данный набор не считается токсичным или опасным при условии правильного использования, для максимальной безопасности соблюдайте следующие меры:

Рекомендации и меры безопасности

- Реагенты данного набора содержат опасные вещества. Несмотря на то, что реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, рекомендуется избегать контакта с глазами и кожей, использовать лабораторные перчатки.
- Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где используются реагенты набора.
- Не пипетируйте ртом.
- Все источники материалов человеческого происхождения, использованные для изготовления реагентов набора, (контролей, стандартов и т.д.) были протестированы методами, одобренными методами на содержание HbsAg, гепатита С и HIV 1, и были получены отрицательные результаты. Однако, так как ни один тест не может полностью гарантировать отсутствие вирусной инфекции, то с контролями, стандартами и образцами необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами, в соответствии с национальными требованиями.
- 5.2 Общие замечания по использованию
- Не смешивайте или не заменяйте реагенты или микропланшет из наборов разных лотов. Это может привести к изменению результатов.
- Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20-26°C/64-78.8°F), тщательно перемешайте жидкости и следуйте рекомендациям протокола метода для получения оптимальных результатов тестирования.
- Не нагревайте компоненты набора до температуры выше 37°C/ 98,6 °F.
- Пипетируйте растворы только новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте субстрат от света.
- Диагноз не должен основываться только на результате одного тестирования. Для постановки точного диагноза необходимо учитывать клиническую историю, симптоматику, а также данные серологических исследований.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно использование свежих образцов сыворотки. Забор крови должен выполняться в соответствии с национальными требованиями.

Не используйте образцы с желтухой, липемией, гемолизом или бактериальным загрязнением. Перед тестированием образцы сыворотки, содержащие частицы, должны быть центрифугированы

для удаления взвеси (<1000 x g). Кровь необходимо собрать в чистые, сухие и пустые пробирки. После отделения образцы сыворотки должны быть протестированы немедленно, или храниться в плотно закрытых пробирках при 2-8°C/35-46°F не дольше трех дней, или должны быть заморожены при -20°C/-4°F для хранения в течение более длительного периода.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл + 80 мл).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл + 980 мл)
- Образцы:
- Разведите образцы сывороток в 101 раз буфером для образцов (1x), например, 1000 мкл буфера для образцов (1x) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!
- Промывка
- Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1x) на 8 лунок, или 200 мл на 96 лунок.
- Например, 4 мл концентрата + 196 мл дистиллированной воды.
- Автоматическая промывка:
- Помните, что для автоматической промывки требуется дополнительный объем для установки вошера, и «мертвый объем» для пипетирования.
- Ручная промывка:
- Удалите жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Интенсивно постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл готового буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще 2 раза.
- Микропланшет
- Рассчитайте количество лунок, необходимое для текущей постановки. Удалите неиспользуемые стрипы из рамки-держателя, поместите их в оригинальный пакет с осушителем, тщательно закройте пакет, храните при 2-8°C/35-46°F.

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Замечание: Если параллельно выполняется тестирование IgG и IgM, стандарты, контроли и образцы должны быть проанализированы дважды, отдельно для каждого класса антител.

1	Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца в соответствующие лунки микропланшета.
2	Внесите по 100 мкл стандартов и контролей в соответствующие лунки микропланшета.
3	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F).
4	Промойте каждую лунку готовым (1x) буфером для промывок 3 раза по 300 мкл.
5	Добавьте в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
6	Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F).
7	Промойте каждую лунку готовым (1x) буфером для промывок 3 раза по 300 мкл.
8	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата ТМВ
9	Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F), в темноте.
10	Внесите в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора, в том же порядке, и с той же скоростью, что и субстрат ТМВ.
11	Инкубируйте 5 минут

12	Аккуратно потрясите микропланшет 5 секунд
13	Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм (опционально: длина волны сравнения: 620 нм) в течение 30 минут после внесения стоп-раствора.

8. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественной оценки результатов постройте калибровочную кривую, откладывая значения ОП каждого стандарта по оси у, и соответствующие значения концентраций стандартов, в Ед/мл, по оси х. Оптимальные результаты получаются при использовании полулогарифмических координат и 4-х параметрической аппроксимации. Используя ОП каждого образца, считайте соответствующие значения концентрации антител по калибровочной кривой, в Ед/мл.

Нормальные значения	Положительные результаты
≤ 15 Ед/мл	> 15 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется анализировать параллельно с образцами, при каждой постановке.

Стандарты IgG		OD 450/620 нм	CV %
0	Ед/мл	0.036	1.9
3	Ед/мл	0.168	2,6
10	Ед/мл	0.303	3.8
30	Ед/мл	0.579	1.4
100	Ед/мл	1.241	1.1
300	Ед/мл	2.130	0.5

Пример расчетов

пациент	Дубли, ОП	Среднее значение ОП	Результат, Ед/мл
P 01	0.705/0.769	0.737	38.3
P 02	1.223/1.234	1.229	96.9

Данные, специфичные для лота, приведены в сертификате контроля качества, поставляемом с набором. Медицинские лаборатории могут выполнять собственный контроль качества, используя собственные контрольные материалы и/или пулы сывороток, как предусмотрено рекомендациями EU. Не используйте этот пример для расчета результатов какого-либо тестирования!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на собственном опыте, контролях, оборудовании и исследуемой популяции, в соответствии с собственной установленной процедурой.

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

- Материал образца: сыворотка
- Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым (1х) буфером для образцов
- Общее время инкубаций: 60 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F)
- Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- Хранение: при 2-8°C/ 35-46°F, в оригинальных флаконах
- Количество определений: 96 тестов.

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность данного метода составила 1.0 Ед/мл.

10.2 Специфичность и чувствительность

Лунки микропланшета покрыты нативными человеческими фосфатидилсерином и протромбином. Не выявлено перекрестной реактивности с другими антигенами. Диагностическая специфичность теста серин-протромбин IgG/IgM составляет 93%. Диагностическая чувствительность метода серин-протромбин IgG/IgM составляет 89%.

10.3 Линейность

Выбранные образцы сывороток были протестированы данным методом, и была показана линейность разведения. Однако, из-за гетерогенности человеческих аутоантител могут встречаться образцы, для которых разведение не будет линейным.

№ образца	разведение	Измеренная концентрация, Ед/мл	Ожидаемая концентрация, Ед/мл	Извлечение, (%)
1	1 / 100	134.0	135.0	99.3
	1 / 200	64.3	67.5	95.3
	1 / 400	35.8	33.8	105.9
	1 / 800	17.1	16.9	101.2
2	1 / 100	96.5	100.0	96.5
	1 / 200	52.0	50.0	104.0
	1 / 400	23.8	25.0	95.2
	1 / 800	11.8	12.5	94.4

10.4 Воспроизводимость

Воспроизводимость (внутри и между сериями) метода оценивали тестированием трех образцов сывороток с концентрациями, лежащими в диапазоне измеряемых значений.

внутри серии			между сериями		
№ образца	Среднее, Ед/мл	CV	№ образца	Среднее, Ед/мл	CV
1	133.0	3,8	1	138.0	4.2
2	74.0	4.2	2	79.0	5.8
3	42.0	4.3	3	38.0	4.9

10.5 Калибровка

Так как не существует Международного референсного стандарта, данный метод прокалиброван в условных единицах (Ед/мл).

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито
и пронумеровано
6 листов

Генеральный Директор
ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения Thrombin IgG/IgM

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Thrombin-GM предназначен для отдельного количественного и качественного определения IgG и/или IgM антител к тромбину в человеческой сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием нативного человеческого тромбина. Метод предназначен для диагностики антифосфолипидного синдрома (APS).

2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Тромбин не является нормальным компонентом циркулирующей крови. Он образуется при каталитическом расщеплении его содержащегося в плазме предшественника, протромбина (фактор II), активированным фактором Стюарта (фактор Ха). Это является завершающим этапом процесса коагуляции. Преобразование требует присутствия активированного кофактора, фактора Va, высвобождаемого из фактора V собственно тромбином, связывание которого с протромбином ферментатически усиливает активность фактора Ха.

Тромбин является гликопротеином, образуемым двумя пептидными цепями, длиной 36 и 259 аминокислотных остатков и связанными дисульфидными мостиками. На поверхности фермента идентифицированы три важных области: каталитическая область, придающая молекуле ее активность как сериновой протеазы, первая наружная область, ответственная за связывание с субстратом (рецептор фибриногена или тромбина) и вторая наружная область, ответственная за связывание с антитромбином II и инактивацию тромбина. Тромбин является не просто ферментом плазмы. Ранее была показана его способность стимулировать тромбоциты и вызывать их растущую агрегацию и высвобождение компонентов гранул.

Присутствие антитромбиновых антител ассоциировано с антифосфолипидным синдромом (APS). Присутствие антител к тромбину коррелирует с тромбозом глубоких вен.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сывороток разводят в 101 раз и инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном. Антитела, присутствующие в образцах сывороток пациентов, связываются с антигеном. Не связавшаяся фракция удаляется при последующей промывке. Вслед за промывкой в лунки добавляется конъюгат антител к иммуноглобулинам человека и пероксидазы хрена (конъюгат), который при дальнейшей инкубации взаимодействует с образовавшимся комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Не связавшийся конъюгат удаляется при последующей промывке.

Добавление субстрата ТМВ вызывает развитие ферментатической цветной (голубое окрашивание) реакции, которая останавливается добавлением разведенной кислоты (окраска меняется на желтую).

Интенсивность окрашивания зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-антитело в лунках микропланшета, и, таким образом, пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образцах сывороток пациентов.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор
5х Буфер для образцов	96 тестов
20 мл концентрата (5х) (белая крышка: желтый раствор)	1 флакон

Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	
50х Буфер для промывок 20 мл концентрата (50х) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: бесцветный раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарт Cut-off 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгаты 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) 15 мл IgM (зеленая крышка: зеленый раствор) Содержат: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	По 1 флакону
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12х8ми луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклопосуда (цилиндр 100 – 1000 мл), пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл), многоканальные пипетки (100 – 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C/35-46°F, в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

5.1 Опасность для здоровья

Данный продукт предназначен только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. Только сотрудники, специально обученные методам диагностики in vitro, могут выполнять тестирование данным методом. Хотя данный продукт не считается чрезвычайно токсичным или опасным при условии правильного использования, соблюдайте следующие рекомендации для наибольшей безопасности:

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. **ВНИМАНИЕ!** Стандарты, контроли и буферы содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. NaN_3 может быть токсичен при проглатывании или попадании на кожу или в глаза. NaN_3 может вступать в реакцию с медью и свинцом водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металла. При утилизации проливайте большим количеством воды для предотвращения накопления азидов металлов. Пожалуйста, выполняйте утилизацию в соответствии с CDC или другими локальными/национальными руководствами.

- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ. Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры ($20\text{--}32^\circ\text{C}/68\text{--}89.6^\circ\text{F}$) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: При использовании автоматических систем рекомендуется использовать температуру инкубации $30^\circ\text{C}/86^\circ\text{F}$.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше $37^\circ\text{C}/98.6^\circ\text{F}$.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.

Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований.

Не используйте желтушную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на низкой скорости ($<1000 \times g$). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки.

После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при $2\text{--}8^\circ\text{C}/35\text{--}46^\circ\text{F}$ до трех дней, или должны быть заморожены при $-20^\circ\text{C}/-4^\circ\text{F}$ для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовление перед пипетированием

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).

Образцы

Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1x), например, 1000 мкл буфера для образцов (1x) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. **ВНИМАНИЕ!** Стандарты, контроли и буферы содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. NaN_3 может быть токсичен при проглатывании или попадании на кожу или в глаза. NaN_3 может вступать в реакцию с медью и свинцом водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металла. При утилизации проливайте большим количеством воды для предотвращения накопления азидов металлов. Пожалуйста, выполняйте утилизацию в соответствии с CDC или другими локальными/национальными руководствами.

- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ. Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры ($20\text{--}32^\circ\text{C}/68\text{--}89.6^\circ\text{F}$) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: При использовании автоматических систем рекомендуется использовать температуру инкубации $30^\circ\text{C}/86^\circ\text{F}$.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше $37^\circ\text{C}/98.6^\circ\text{F}$.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.

Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований.

Не используйте желтушную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на низкой скорости ($<1000 \times g$). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки.

После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при $2\text{--}8^\circ\text{C}/35\text{--}46^\circ\text{F}$ до трех дней, или должны быть заморожены при $-20^\circ\text{C}/-4^\circ\text{F}$ для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовление перед пипетированием

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).

Образцы

Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1x), например, 1000 мкл буфера для образцов (1x) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1х) на 8 лунок или 200 мл для промывки 96 лунок. Например, 4 мл концентрата буфера для промывок плюс 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Рассчитайте избыточный объем, требуемый для установки инструмента и «мертвый» объем для автоматического пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите полностью жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще два раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, требуемое для текущего анализа. Удалите лишние лунки из держателя, поместите их в поставляемый пластиковый пакет с осушителем, тщательно закройте его и храните при 2-8°C/35-46°F

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Схема пипетирования приведена в приложении А, процедура теста описана в приложении В. Все образцы и стандарты рекомендуется анализировать в дублях. Стандарт Cut-off необходимо анализировать только при выполнении качественного анализа.

ЗАМЕЧАНИЕ: При параллельном определении IgG и IgM, все стандарты, контроли и образцы должны анализироваться дважды, отдельно для каждого класса иммуноглобулинов.

- Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца сыворотки пациента в предназначенные для образцов лунки.
- Внесите по 100 мкл стандартов ИЛИ контроля «cut-off» и отрицательного и положительного контролей в соответствующие лунки.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
- Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
- Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F), в темноте.
- Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор субстрата.
- Инкубируйте не менее 5 минут.
- Аккуратно перемешайте микропланшет в течение 5 секунд.
- Считайте абсорбцию при 450 нм (опционально при 450/620 нм) в течение 30 минут

8. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для количественной оценки постройте калибровочную кривую, откладывая оптическую плотность (ОП) каждого калибратора (по оси у) против соответствующих значений концентраций в Ед/мл (по оси х). Для получения наиболее качественных результатов рекомендуется использовать log/lin координаты и 4хпараметрическую аппроксимацию. Считайте концентрацию антител, выраженную в Ед/мл, используя ОП, полученную для каждого образца.

Нормальный диапазон	Сомнительные результаты	Положительные результаты
< 12 Ед/мл	12-18 Ед/мл	>18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется пипетировать в дублях при каждой постановке.

Стандарты IgG/М	ОП 450/620 нм	CV % (отклонения)
0 Ед/мл	0.029	2.3
3 Ед/мл	0.145	3.1
10 Ед/мл	0.266	1.3
30 Ед/мл	0.556	7.1
100 Ед/мл	1.145	2.8
300 Ед/мл	2.025	0.1

Пример расчетов:

Пациент	Дубли (ОП)	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P01	0.782/0.853	0.818	54.9
P02	1.360/1.328	1.344	129.0

Специфические для лота данные приведены в прилагаемом к набору листе контроля качества. Медицинские лаборатории могут проводить внутренний контроль качества, используя свои собственные контроли и/или приготовленные в лаборатории пулы сывороток, как предусмотрено руководством EU. Не используйте данный пример для расчета результатов тестирования образцов сывороток пациентов!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на использовании собственной технологии, контролях, оборудовании и популяции, согласно собственным установленным процедурам.

Для качественного определения считайте ОП образцов и контроля «cut-off». Сравните ОП, полученную для образцов сывороток пациентов, и ОП контроля «cut-off». При интерпретации качественного анализа рекомендуется считать сомнительными результаты, попадающие в диапазон $\pm 20\%$ от значения стандарта cut-off. Все образцы, ОП которых выше данного диапазона, являются положительными, а все образцы, ОП которых ниже данного диапазона, являются отрицательными.

Отрицательный: ОП пациента $< 0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Сомнительный: $0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»} < \text{ОП пациента} < 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Положительный: ОП пациента $> 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Материал образца: сыворотка
- Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым буфером для образцов
- Общее время инкубации: 90 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F)
- Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- Хранение: при 2-8°C/35-46°F, только в оригинальных флаконах
- Количество определений: 96 определений

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Аналитическая чувствительность

Тестирование буфера для образцов данным методом 30 раз показало аналитическую чувствительность метода 1.0 Ед/мл

10.2 Специфичность и чувствительность

Микропланшет покрыт нативным человеческим тромбином

Не выявлено перекрестной реактивности с другими аутоантигенами.

10.3 Линейность

Образцы сывороток были протестированы данным методом и была показана линейность разведения. Однако из-за гетерогенной природы человеческих аутоантител могут встречаться образцы, которые не подчиняются этому правилу.

№ образ	Коэф. разведе	Измененная	Ожидаемая	извлечен ие (%)
1	1 /100	202.3	200.0	101.0
	1 /200	98.4	100.0	98.4
	1 /400	52.3	50.0	104.6
	1/800	23.4	25.0	93.6
2	1 /100	85.0	86.0	98.8
	1 /200	41.4	43.0	96.3
	1/400	19.6	21.5	91.2
	1/800	10.1	10.8	93.5

10.4 Точность и воспроизводимость

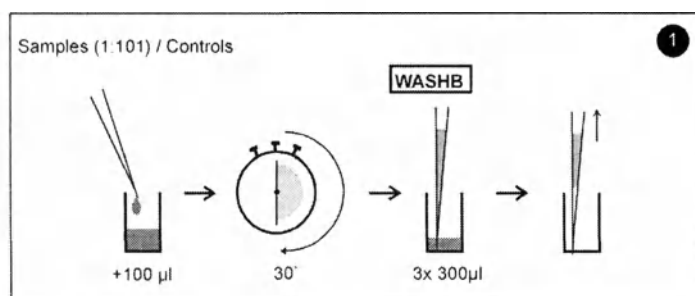
Для определения воспроизводимости метода, внутри серии и между сериями, были протестированы три образца сывороток с концентрациями в диапазоне калибровочной кривой.

внутри серии			между сериями		
№ образ	Средн	CV (%)	№ образ	Средн	CV (%)
1	20.7	1.2	1	18.4	1.8
2	45.2	3.1	2	47.5	2.6
3	114.5	6.8	3	126.4	6.5

10.5 Калибровка

Из-за отсутствия международных референсных стандартов данный метод прокалиброван в условных единицах (Ед/мл).

Приложение А: Схема пипетирования



Рекомендуется пипетировать стандарты, контроли и образцы следующим образом:
Для количественной оценки используйте стандарты для построения калибровочной кривой.
Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off».

Для количественной оценки используйте стандарты для						
	1	2	3	4	5	6
A	CalA	CalE	P1			
B	CalA	CalE	P1			
C	CalB	CalF	P2			
D	CalB	CalF	P2			
E	CalC	PC	P3			
F	CalC	PC	P3			
G	CalD	NC				
H	CalD	NC				

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off»						
	7	8	9	10	11	12

A	NC	P2				
B	NC	P2				
C	CC	P3				
D	CC	P3				
E	PC					
F	PC					
G	P1					
H	P1					

CalA: стандарт A,

CalB: стандарт B,

CalC: стандарт C,

CalD: стандарт D,

CalE: стандарт E,

CalF: стандарт F

PC: положительный контроль

NC: отрицательный контроль

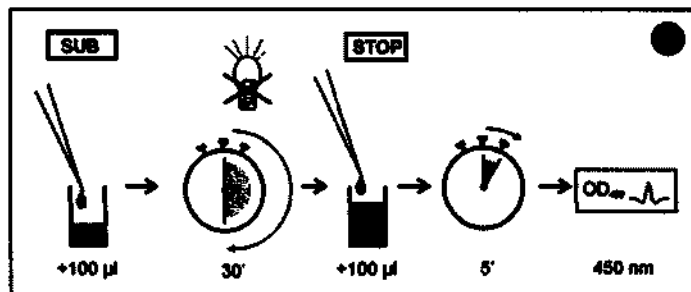
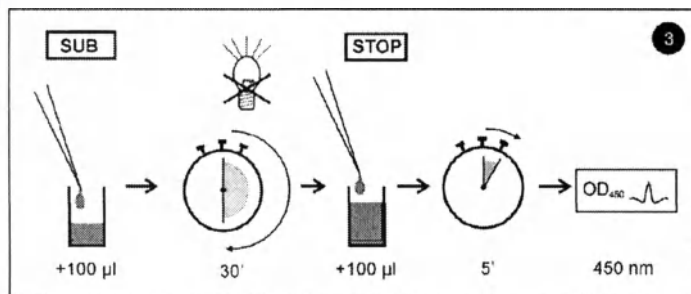
CC: стандарт «Cut-off»

P1: образец сыворотки 1-го пациента

P2: образец сыворотки 2-го пациента

P3: образец сыворотки 3-го пациента

Приложение В: Процедура анализа



«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

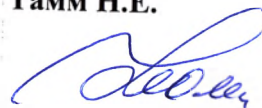
и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения Choline-GM

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Cholin-GM предназначен для отдельного количественного и качественного определения IgG и/или IgM антител к фосфатидилхолину в человеческой сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием высокочистого фосфатидилхолина и нативного человеческого β 2-гликопротеина I.

Эти антитела распознают специфические эпитопы комплекса, образованного фосфатидилхолином и β 2-гликопротеином I. Метод предназначен для диагностики и оценки риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом (APS).

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Антитела к фосфатидилхолину относятся к группе антифосфолипидных антител, направленных к таким фосфолипидам, как кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, фингомиелин и фосфатидиловая кислота. Фосфолипиды являются компонентами биологических мембран.

Антифосфолипидные антитела часто выявляются в сыворотке пациентов с системной красной волчанкой (SLE) и подобными заболеваниями. Присутствие антифосфолипидных антител у пациентов с SLE и другими подобными заболеваниями типично для вторичного антифосфолипидного синдрома (APS). И наоборот, присутствие антифосфолипидных антител у больных, не страдающих другими аутоиммунными заболеваниями свидетельствует о первичном APS.

Многие исследования показали наличие корреляции между этими антителами и повышенной встречаемостью тромбоза, тромбоцитопении и привычных выкидышей (в результате инфаркта плаценты). Точные механизмы по которым патогенные антифосфолипидные антитела индуцируют развитие тромбоза пока точно не установлены.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сывороток разводят в 101 раз и инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном. Антитела, присутствующие в образцах сывороток пациентов, связываются с антигеном. Не связавшаяся фракция удаляется при последующей промывке. Вслед за промывкой в лунки добавляется конъюгат антител к иммуноглобулинам человека и пероксидазы хрена (конъюгат), который при дальнейшей инкубации взаимодействует с образовавшимся комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Не связавшийся конъюгат удаляется при последующей промывке.

Добавление субстрата ТМВ вызывает развитие ферментатической цветной (голубое окрашивание) реакции, которая останавливается добавлением разведенной кислоты (окраска меняется на желтую).

Интенсивность окрашивания зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-антитело в лунках микропланшета, и, таким образом, пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образцах сывороток пациентов.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов
5x Буфер для образцов 20 мл концентрата (5x) (белая крышка: желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон

50x Буфер для промывок 20 мл концентрата (50x) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: бесцветный раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарт Cut-off 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгаты 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) 15 мл IgM (зеленая крышка: зеленый раствор) Содержат: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	По 1 флакону
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12x8мм луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклянная посуда (цилиндр 100 – 1000 мл), пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл), многоканальные пипетки (100 – 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C/35-46°F, в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

5.1 Опасность для здоровья

Данный продукт предназначен только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. Только сотрудники, специально обученные методам диагностики in vitro, могут выполнять тестирование данным методом. Хотя данный продукт не считается чрезвычайно токсичным или опасным при условии правильного использования, соблюдайте следующие рекомендации для наибольшей безопасности:

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. **ВНИМАНИЕ!** Стандарты, контроли и буферы содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. NaN_3 может быть токсичен при проглатывании или попадании на кожу или в глаза. NaN_3 может вступать в реакцию с медью и свинцом водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металла. При утилизации проливайте большим количеством воды для предотвращения накопления азидов металлов. Пожалуйста, выполняйте утилизацию в соответствии с CDC или другими локальными/национальными руководствами. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ. Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры ($20\text{--}32^\circ\text{C}/68\text{--}89.6^\circ\text{F}$) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: При использовании автоматических систем рекомендуется использовать температуру инкубации $30^\circ\text{C}/86^\circ\text{F}$.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше $37^\circ\text{C}/98.6^\circ\text{F}$.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.
- Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований.
- Не используйте желтушную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на низкой скорости ($<1000 \times g$). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки. После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при $2\text{--}8^\circ\text{C}/35\text{--}46^\circ\text{F}$ до трех дней, или должны быть заморожены при $-20^\circ\text{C}/-4^\circ\text{F}$ для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовления перед пипетированием

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).

Образцы

Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1х), например, 1000 мкл буфера для образцов (1х) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1х) на 8 лунок или 200 мл для промывки 96 лунок. Например, 4 мл концентрата буфера для промывок плюс 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Рассчитайте избыточный объем, требуемый для установки инструмента и «мертвый» объем для автоматического пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите полностью жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще два раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, требуемое для текущего анализа. Удалите лишние лунки из держателя, поместите их в поставляемый пластиковый пакет с осушителем, тщательно закройте его и храните при 2-8°C/35-46°F

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Схема пипетирования приведена в приложении А, процедура теста описана в приложении В. Все образцы и стандарты рекомендуется анализировать в дублях. Стандарт Cut-off необходимо анализировать только при выполнении качественного анализа.

ЗАМЕЧАНИЕ: При параллельном определении IgG и IgM, все стандарты, контроли и образцы должны анализироваться дважды, отдельно для каждого класса иммуноглобулинов.

Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца сыворотки пациента в предназначенные для образцов лунки.

Внесите по 100 мкл стандартов ИЛИ контроля «cut-off» и отрицательного и положительного контролей в соответствующие лунки.

Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).

Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).

Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую лунку.

Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).

Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).

Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.

Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F), в темноте.

Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор субстрата.

Инкубируйте не менее 5 минут.

Аккуратно перемешайте микропланшет в течение 5 секунд.

Считайте абсорбцию при 450 нм (опционально при 450/620 нм) в течение 30 минут

8. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для количественной оценки постройте калибровочную кривую, откладывая оптическую плотность (ОП) каждого калибратора (по оси у) против соответствующих значений концентраций в Ед/мл (по оси х).

Для получения наиболее качественных результатов рекомендуется использовать $\log/iin$ координаты и 4хпараметрическую аппроксимацию. Считайте концентрацию антител, выраженную в Ед/мл, используя ОП, полученную для каждого образца.

Нормальный диапазон	Сомнительные результаты	Положительные результаты
< 12 Ед/мл	12-18 Ед/мл	>18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется пипетировать в дублях при каждой постановке.

Стандарты IgG/M	ОП 450/620 нм	CV % (отклонения)
0 Ед/мл	0.049	0.0
3 Ед/мл	0.164	2.6
10 Ед/мл	0.332	2.5
30 Ед/мл	0.675	0.9
100 Ед/мл	1.387	0.0
300 Ед/мл	2.272	0.5

Пример расчетов:

Пациент	Дубли (ОП)	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P01	1.093/1.	105	1.099
P02	0.804/0.	820	0.812

Специфические для лота данные приведены в прилагаемом к набору листе контроля качества. Медицинские лаборатории могут проводить внутренний контроль качества, используя свои собственные контроли и/или приготовленные в лаборатории пулы сывороток, как предусмотрено руководством EU. Не используйте данный пример для расчета результатов тестирования образцов сывороток пациентов!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на использовании собственной технологии, контролях, оборудовании и популяции, согласно собственным установленным процедурам.

Для качественного определения считайте ОП образцов и контроля «cut-off». Сравните ОП, полученную для образцов сывороток пациентов, и ОП контроля «cut-off». При интерпретации качественного анализа рекомендуется считать сомнительными результаты, попадающие в диапазон $\pm 20\%$ от значения стандарта cut-off. Все образцы, ОП которых выше данного диапазона, являются положительными, а все образцы, ОП которых ниже данного диапазона, являются отрицательными.

Отрицательный: ОП пациента $< 0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Сомнительный: $0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»} < \text{ОП пациента} < 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Положительный: ОП пациента $> 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Материал образца: сыворотка

Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым буфером для образцов

Общее время инкубации: 90 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F)

Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл

Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл

Хранение: при 2-8°C/35-46°F, только в оригинальных флаконах

Количество определений: 96 определений

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Аналитическая чувствительность

Тестирование буфера для образцов данным методом 30 раз показало аналитическую чувствительность метода 1.0 Ед/мл

10.2 Специфичность и чувствительность

Микропланшет покрыт высокочистым фосфатидилхолином и нативным человеческим $\beta 2$ -гликопротеином I

Не выявлено перекрестной реактивности с другими аутоантигенами. Данные были получены с помощью набора Cholin-GM (кат № RE70461)

Корреляция

Сравнимость результатов анализа оценивали тестируя более 30 образцов данным методом и другим коммерчески доступным ИФА методом. Линейный регрессионный анализ результатов, полученных с помощью двух методов показал, что они эквивалентны. Данные доступны по запросу.

10.3 Линейность

Образцы сывороток были протестированы данным методом и была показана линейность разведения. Однако из-за гетерогенной природы человеческих аутоантител могут встречаться образцы, которые не подчиняются этому правилу.

№ образ	Коеф. разведе	Измененная	Ожидаемая	извлечен ие (%)
1	1/100	141.0	140.0	100.7
	1/200	69.0	70.0	98.6
	1/400	36.9	35.0	105.4
	1/800	18.1	17.5	103.4
2	1/100	47.1	46.0	102.4
	1/200	24.6	23.0	107.0
	1/400	12.1	11.5	105.2
	1/800	6.2	5.8	106.9

10.4 Точность и воспроизводимость

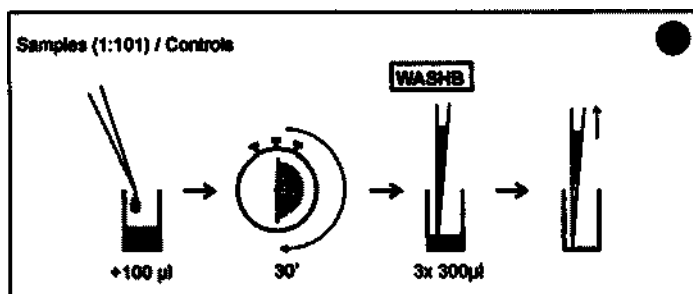
Для определения воспроизводимости метода, внутри серии и между сериями, были протестированы три образца сывороток с концентрациями в диапазоне калибровочной кривой.

внутри серии			между сериями		
№	Средн	CV	№	Средн	CV
1	145.0	2.8	1	150.0	3.1
2	48.0	3.6	2	53.0	4.2
3	21.0	2.2	3	24.0	4.8

10.5 Калибровка

Из-за отсутствия международных референсных стандартов данный метод прокалиброван в условных единицах (Ед/мл).

Приложение А: Схема пипетирования



Рекомендуется пипетировать стандарты, контроли и образцы следующим образом:

Для количественной оценки используйте стандарты для построения калибровочной кривой.

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off».

	Для количественной оценки используйте стандарты для					
	1	2	3	4	5	6
A	CalA	CalE	P1			
B	CalA	CalE	P1			

C	CalB	CalF	P2			
D	CalB	CalF	P2			
E	CalC	PC	P3			
F	CalC	PC	P3			
G	CalD	NC				
H	CalD	NC				

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off»						
	7	8	9	10	11	12
A	NC	P2				
B	NC	P2				
C	CC	P3				
D	CC	P3				
E	PC					
F	PC					
G	P1					
H	P1					

CalA: стандарт A,

CalB: стандарт B,

CalC: стандарт C,

CalD: стандарт D,

CalE: стандарт E,

CalF: стандарт F

PC: положительный контроль

NC: отрицательный контроль

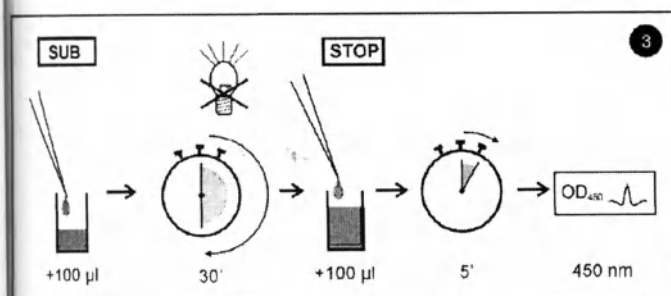
CC: стандарт «Cut-off»

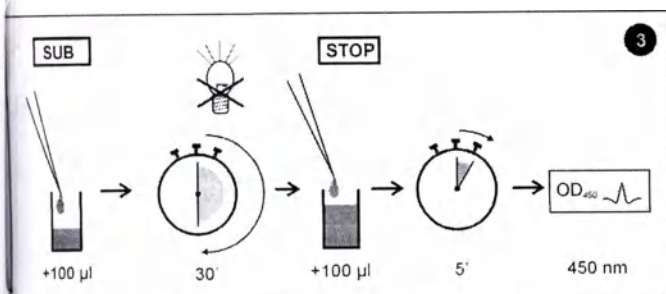
P1: образец сыворотки 1-го пациента

P2: образец сыворотки 2-го пациента

P3: образец сыворотки 3-го пациента

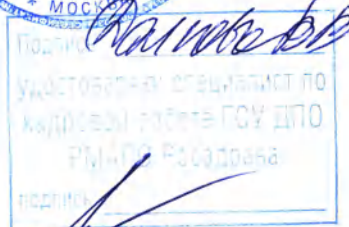
Приложение В: Процедура анализа





«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011г.

УТВЕР
Прик
От _____

1. НА
раств
имму
Данн
2. КЛ
неизн
счен
важн
виру
сыво
анти
имею
как о
забол
пече
у 20%
анти
клон
являе

биохи
согла
анти
у кот
непр

3. ПП

спец
анти
лунк
кото
связа

кото
Инте
с ком
конц

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



От	№
----	---

2011г.



По применению иммуноферментного набора для определения SLA/LP-Ab

Данный набор предназначен для диагностики аутоиммунных гепатитов (АИГ).

ANA/SMA и анти-SLA положительные пациенты имеют схожие в большей части клинические, биохимические, гистологические и прогностические особенности. Разграничение различных подгрупп согласно статусу аутоантител клинического значения не имеет. Однако, тестирование на присутствие анти-SLA аутоантител является очень важным инструментом в диагностике АИВ для многих пациентов, у которых не были обнаружены другие аутоантитела и, следовательно, им может быть поставлен неправильный диагноз.

Добавление субстрата ТМВ вызывает колориметрическую (голубое окрашивание) реакцию, которая останавливается добавлением разведенной кислоты (окраска меняется на желтую). Интенсивность образования окрашивания из хромогена зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-антитело в лунках микропланшета, и, таким образом, пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образцах сывороток пациентов.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов
5х Буфер для образцов 20 мл концентрата (5х) (белая крышка: желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
50х Буфер для промывок 20 мл концентрата (50х) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: бесцветный раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Cut-off контроль 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгат 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) Содержит: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	1 флакон
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12х8ми луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклопосуда, пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C/35-46°F, в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

5.1 Опасность для здоровья

Данный продукт предназначен только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. Только сотрудники, специально обученные методам диагностики in vitro, могут выполнять тестирование данным методом. Хотя данный продукт не считается чрезвычайно токсичным или опасным при условии правильного использования, соблюдайте следующие рекомендации для наибольшей безопасности:

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ. Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры (20-26°C/64-78.8°F) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: для автоматизированных систем мы рекомендуем проводить анализ при 30°C.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше 37°C/ 98,6 °F.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.
- Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований.

Не используйте иктеричную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на низкой скорости (<1000 x g). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки.

После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при 2-8°C/35-46°F до трех дней, или должны быть заморожены при -20°C/-4°F для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовления перед пипетированием

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).

Образцы

Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1x), например, 1000 мкл буфера для образцов (1x) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1х) на 8 лунок или 200 мл для промывки 96 лунок. Например, 4 мл концентрата буфера для промывок плюс 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Рассчитайте избыточный объем, требуемый для установки инструмента и «мертвый» объем для автоматического пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите полностью жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще два раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, требуемое для текущего анализа. Удалите лишние лунки из держателя, поместите их в поставляемый пластиковый пакет с осушителем, тщательно закройте его и храните при 2-8°C/35-46°F

12 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Схема пипетирования приведена в приложении А, процедура теста описана в приложении В:

- Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца сыворотки пациента в предназначенные для образцов лунки.
- Внесите по 100 мкл стандартов ИЛИ контроля «cut-off» и отрицательного и положительного контролей в соответствующие лунки.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
- Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного).
- Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F) в темноте.
- Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор субстрата.
- Инкубируйте не менее 5 минут.
- Аккуратно перемешайте микропланшет в течение 5 секунд.
- Считайте абсорбцию при 450 нм (опционально при 450/620 нм) в течение 30 минут

КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для количественной оценки постройте калибровочную кривую, откладывая оптическую плотность (ОП) каждого калибратора (по оси у) против соответствующих значений концентраций в Ед/мл (по оси х). Для получения более качественных результатов рекомендуется использовать log/lin координаты и 4хпараметрическую аппроксимацию. Считайте концентрацию антител, выраженную в Ед/мл, используя ОП, полученную для каждого образца.

Нормальный диапазон	Сомнительные результаты	Положительные результаты
< 12 Ед/мл	12-18 Ед/мл	> 18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется пипетировать в дублях при каждой постановке.

Стандарты	ОП 450/620 нм	CV % (отклонения)
0 Ед/мл	0.041	2.7
3 Ед/мл	0.178	2.4
10 Ед/мл	0.356	1.0
30 Ед/мл	0.725	0.9
100 Ед/мл	1.325	2.8
300 Ед/мл	2.070	1.6

Пример расчетов:

Пациент	Дубли (ОП)	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P01	0.902/0.888	0.895	46.5
P02	0.566/0.572	0.569	20.6

Специфические для лота данные приведены в прилагаемом к набору листе контроля качества.

Медицинские лаборатории могут проводить внутренний контроль качества, используя свои собственные контроли и/или приготовленные в лаборатории пулы сывороток, как предусмотрено руководством EU. Не используйте данный пример для расчета результатов тестирования образцов сывороток пациентов!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на использовании собственной технологии, контролях, оборудовании и популяции, согласно собственным установленным процедурам.

Для качественного определения считайте ОП образцов и контроля «cut-off». Сравните ОП, полученную для пациентов, и ОП контроля «cut-off». Образцы, ОП которых в пределах 20% ниже или выше, чем ОП контроля «cut-off», расцениваются как сомнительные. Все образцы, ОП которых выше являются положительными. Все образцы, ОП которых ниже являются отрицательными.

Отрицательный: ОП пациента $< 0,8 \times \text{ОП «cut-off»}$

Сомнительный: $0,8 \times \text{ОП «cut-off»} \leq \text{ОП пациента} \leq 1,2 \times \text{ОП «cut-off»}$

Положительный: ОП пациента $> 1,2 \times \text{ОП «cut-off»}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Материал образца: сыворотка
- Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым буфером для образцов
- Общее время инкубации: 90 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F)
- Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- Хранение: при 2-8°C/35-46°F, только в оригинальных флаконах
- Количество определений: 96 определений

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность метода составляет 1.0 Ед/мл

10.2 Специфичность и чувствительность

Микропланшет покрыт нативным растворимым антигеном печени, SLA.

Не выявлено перекрестной реактивности с другими аутоантигенами. Метод AESKULISA SLA/LP показал 100% диагностическую специфичность. Метод AESKULISA SLA/LP показал диагностическую чувствительность 30%. [5]. Эти данные были получены для данного метода SLA (REF RE70791).

Корреляция:

Сопоставимость результатов было оценена по крайней мере на 30 сыворотках, которые были протестированы параллельно данным методом и другим коммерчески доступным ИФА методом. Полученная линейная регрессия для двух тестов свидетельствует о том, что эти продукты эквивалентны. Данные можно получить по запросу.

10.3 Линейность

Образцы сывороток были протестированы данным методом и была показана линейность разведения. Однако из-за гетерогенной природы человеческих аутоантител могут встречаться образцы, которые не подчиняются этому правилу.

№ образ	Коэф. разведе	Измененная	Ожидаемая	извлечен ие (%)
1	1/100	156.0	155.0	100.7
	1/200	79.0	77.5	101.9
	1/400	41.0	38.5	105.7
	1/800	20.4	19.4	105.2
2	1/100	83.0	82.0	101.2
	1/200	43.0	41.0	102.4
	1/400	21.0	20.5	102.4
	1/800	11.0	10.3	106.8

10.4 Точность и воспроизводимость

Для определения воспроизводимости метода, внутри серии и между сериями были протестированы три образца сывороток с концентрациями в диапазоне калибровочной кривой.

внутри серии			между сериями		
№ образ	Средн	CV (%)	№ образ	Средн	CV (%)
1	160.0	2.4	1	154.0	1.8
2	85.0	2.8	2	80.0	2.8
3	20.8	3.1	3	18.4	3.4

10.5 Калибровка

Из-за отсутствия международных референсных стандартов данный метод прокалиброван в произвольно выбранных единицах (Ед/мл).

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

6 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



2011г.

ИНСТРУКЦИЯ

*По применению иммуноферментного набора для определения **Laminin Ab**.*

Иммуноферментный набор для количественного и качественного определения антител к ламинину-1 в человеческой сыворотке.

Количество образцов 96 (со съемными стрипами)

Хранение при 2-8°C

Только для диагностики in vitro

Назначение

Данный набор Laminin Ab ELISA предназначен для отдельного количественного определения и качественного определения IgG антител к ламинину-1 в человеческой сыворотке. Антитела к ламинину-1 могут быть обнаружены у пациенток с привычным выкидышем и бесплодием, ассоциированным с эндометриозом.

1. Введение

Ламинины, мультифункциональные гликопротеины базальных мембран участвуют в различных биологических процессах, включая содействие клеточной адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке, а также образование поддерживающей сети базальных мембран. К настоящему времени известны не менее 15 различных изоформ ламинины, и показано, что их экспрессия тканеспецифична на разных стадиях развития.

Ламинин-1, состоящий из $\alpha 1$, $\beta 1$ и $\gamma 1$ цепей, является самым ранним компонентом сети, синтезируемым в процессе эмбриогенеза, и играет важную роль в эмбриональном развитии, имплантации эмбриона и плацентации. В бластоцитах или мышинных имплантируемых эмбрионах, ламинин-1 локализован во внутренней клеточной массе и базальной мембране трофобласта. В процессе имплантации ламинин-1 экспрессируется базальной мембраной хориона и мембраной Рейхерта около эктоплацентарного бугорка.

Недавние исследования показали, что у человека IgG аутоантитела к ламинину-1 в значительной степени ассоциированы с привычным невынашиванием беременности в первом триместре. На животных моделях иммунизация мышинным ламинином-1 вызывала выкидыши у анти-ламинин-1 положительных мышей. Было высказано предположение, что анти-ламинин-1 антитела могут пагубно влиять на события ранних стадий беременности, такие как имплантация эмбриона, эмбриогенез, васкуляризация плаценты и/или плацентарный транспорт питательных веществ.

Недавние исследования показали, что у людей анти-ламинин-1 IgG антитела в значительной степени ассоциированы с эндометриозом у больных с бесплодием.

Таким образом, измерение IgG анти-ламинин-1 аутоантител может быть полезным инструментом в диагностике репродуктивной дисфункции, привычного выкидыша и

бесплодия, ассоциированного с эндометриозом.

2. Принцип метода

Образцы, разведенные 1:101 инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном. Если в образцах присутствуют антитела, то они связываются с антигеном. Несвязавшуюся фракцию удаляют промывкой. Затем в лунки вносят антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена (конъюгат), которые взаимодействуют с комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Несвязавшийся конъюгат удаляется при промывке.

После добавления субстратного раствора развивается цветная реакция (голубое окрашивание), которую останавливают кислым стоп-раствором (окрашивание меняется на желтое). Интенсивность развившегося окрашивания зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-антитело, и пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образце.

3. Поставляемые реагенты:

Количество	Компонент
Должны быть разведены:	
1 x 20 мл	Буфер для разведения образцов, концентрат 5x (белая крышка, желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия (консервант)
1 x 20 мл	Буфер для промывок, концентрат 50x (белая крышка, зеленый раствор). Содержит: Tris, NaCl, Tween, азид натрия (консервант)
Готовы к использованию:	
1 x 1.5 мл	Отрицательный контроль (зеленая крышка, бесцветный раствор) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)
1 x 1.5 мл	Положительный контроль (красная крышка, желтый раствор) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)
1 x 1.5 мл	Cut-off контроль (голубая крышка, желтый раствор) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)
6 x 1.5 мл	Стандарты 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (желтый раствор: интенсивность увеличивается с увеличением концентрации) содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)
1 x 15 мл	Ферментный конъюгат, IgG (голубая крышка, голубой раствор), содержит: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена
1 x 15 мл	Субстратный раствор ТМВ (черная крышка) Содержит стабилизированный раствор ТМВ/ H ₂ O ₂ .
1 x 15 мл	Стоп-раствор. (белая крышка, бесцветный раствор)

	Содержит 1 М соляную кислоту
1 x 12x8	Микропланшет. 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов, покрытых см. раздел 1.

МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- 1 Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450 нм (длина волны сравнения 620 нм, 600-690 нм)
- 2 Стеклянная посуда, пробирки для разведения образцов
- 3 Вортекс
- 4 Микропипетки для внесения объемов 10; 100; 200; 500; 1000 мкл
- 5 Автоматическое или полуавтоматическое промывающее устройство, емкость для буфера для промывок
- 6 Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер.
- 7 Данный метод разработан для использования с очищенной водой, согласно определению Фармакопеи США (USP 26 - NF 21) и Европейской Фармакопеи (Eur.Ph. 4th ed.).

4. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

- 1 Все реагенты и микропланшет должны храниться при температуре 2-8°C, в оригинальных контейнерах.
- 2 После приготовления растворы стабильны в течение 1 месяца при 4°C. Реагенты и микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Избегайте попадания света на раствор ТМВ. Храните микропланшет в оригинальном тщательно закрытом пакете, с осушителем.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1 Безопасность здоровья

Набор – только для диагностики *in vitro*. Для использования специалистами. Хотя данный набор не считается токсичным или опасным при условии правильного использования, для максимальной безопасности соблюдайте следующие меры:

Рекомендации и меры безопасности

Реагенты данного набора содержат опасные вещества. Несмотря на то, что реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, рекомендуется избегать контакта с глазами и кожей, использовать лабораторные перчатки.

- 1 Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где используются реагенты набора.
- 2 Не пипетируйте ртом.

Все источники материалов человеческого происхождения, использованные для изготовления реагентов набора, (контролей, стандартов и т.д.) были протестированы методами, одобренными методами на содержание HbsAg, гепатита С и HIV 1, и были получены отрицательные результаты. Однако, так как ни один тест не может полностью гарантировать отсутствие вирусной инфекции, то с контролями, стандартами и образцами необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами, в соответствии с национальными требованиями.

5.2 Общие замечания по использованию

- 1 Не смешивайте или не заменяйте реагенты или микропланшет из наборов разных

лотов. Это может привести к изменению результатов.

- 2 Перед использованием все компоненты должны достичь комнатной температуры (20-26°C/64-78.8°F), тщательно перемешайте жидкости и следуйте рекомендациям протокола метода для получения оптимальных результатов тестирования.
- 3 Не нагревайте компоненты набора до температуры выше 37°C/ 98,6 °F.
- 4 Пипетируйте растворы только новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте субстрат от света.
- 5 Диагноз не должен основываться только на результате одного тестирования. Для постановки точного диагноза необходимо учитывать клиническую историю, симптоматику, а также данные серологических исследований.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Предпочтительно использование свежих образцов сыворотки. Забор крови должен выполняться в соответствии с национальными требованиями.

Не используйте образцы с желтухой, липемией, гемолизом или бактериальным загрязнением. Перед тестированием образцы сыворотки, содержащие частицы, должны быть центрифугированы для удаления взвеси (<1000 x g). Кровь необходимо собрать в чистые, сухие и пустые пробирки. После отделения образцы сыворотки должны быть протестированы немедленно, или храниться в плотно закрытых пробирках при 2-8°C/35-46°F не дольше трех дней, или должны быть заморожены при -20°C/-4°F для хранения в течение более длительного периода.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

- 1 Разведите концентрированные реагенты:
- 2 Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл + 80 мл).
- 3 Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл + 980 мл)

Образцы:

Разведите образцы сывороток в 101 раз буфером для образцов (1x), например, 1000 мкл буфера для образцов (1x) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1x) на 8 лунок, или 200 мл на 96 лунок.

Например, 4 мл концентрата + 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Помните, что для автоматической промывки требуется дополнительный объем для установки вошера, и «мертвый объем» для пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Интенсивно постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл готового буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще 2 раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, необходимое для текущей постановки. Удалите неиспользуемые стрипы из рамки-держателя, поместите их в оригинальный пакет с осушителем, тщательно закройте пакет, храните при 2-8°C/35-46°F.

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Замечание: Схема пипетирования приведена в приложении А, краткая процедура метода дана в приложении В.

Рекомендуется стандарты и образцы анализировать в дублях.

Стандарт Cut-off должен использоваться только для качественного анализа.

1	Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца в соответствующие лунки микропланшета.
2	Внесите по 100 мкл стандартов или стандарта cut-off, и контролей в соответствующие лунки микропланшета.
3	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F).
4	Промойте каждую лунку готовым (1х) буфером для промывок 3 раза по 300 мкл.
5	Добавьте в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
6	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F).
7	Промойте каждую лунку готовым (1х) буфером для промывок 3 раза по 300 мкл.
8	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата ТМВ
9	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F), в темноте.
10	Внесите в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора, в том же порядке, и с той же скоростью, что и субстрат ТМВ.
11	Инкубируйте 5 минут
12	Аккуратно потрясите микропланшет 5 секунд
13	Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм (опционально: длина волны сравнения: 620 нм) в течение 30 минут после внесения стоп-раствора.

8. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественной оценки результатов постройте калибровочную кривую, откладывая значения ОП каждого стандарта по оси у, и соответствующие значения концентраций стандартов, в Ед/мл, по оси х. Оптимальные результаты получаются при использовании полулогарифмических координат и 4-х параметрической аппроксимации. Используя ОП каждого образца, считайте соответствующие значения концентрации антител по калибровочной кривой, в Ед/мл.

Нормальные значения	Сомнительные результаты	Положительные результаты
≤ 12 Ед/мл	12 – 18 Ед/мл	> 18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется анализировать параллельно с образцами, при каждой постановке.

Стандарты IgG	OD 450/620 нм	CV %
0 Ед/мл	0.046	1.5
3 Ед/мл	0.145	4.4

10	Ед/мл	0.301	6.8
30	Ед/мл	0.609	9.3
100	Ед/мл	1.265	2.2
300	Ед/мл	2.102	2.8

Пример расчетов

пациент	Дубли, ОП	Среднее значение ОП	Результат, Ед/мл
P 01	0.943/0.975	0.959	62.4
P 02	0.618/0.633	0.626	31.0

Данные, специфичные для лота, приведены в сертификате контроля качества, поставляемом с набором. Медицинские лаборатории могут выполнять собственный контроль качества, используя собственные контрольные материалы и/или пулы сывороток, как предусмотрено рекомендациями ЕU. Не используйте этот пример для расчета результатов какого-либо тестирования!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на собственном опыте, контролях, оборудовании и исследуемой популяции, в соответствии с собственной установленной процедурой.

Для качественной интерпретации считайте ОП калибратора cut-off и образцов.

Сравните ОП образцов с ОП калибратора cut-off. Образцы, значения ОП которых лежат в диапазоне $\pm 20\%$ от значения ОП cut-off рекомендуется считать сомнительными. Все образцы со значениями ОП выше, должны считаться положительными, а со значениями ОП ниже должны считаться отрицательными.

Отрицательные: ОП образца $< 0.8 \times \text{ОП cut-off}$

Сомнительные: $0.8 \times \text{ОП cut-off} \leq \text{ОП образца} \leq 1.2 \times \text{ОП cut-off}$

Положительные: ОП образца $> 1.2 \times \text{ОП cut-off}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

- 1 Материал образца: сыворотка
- 2 Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым (1х) буфером для образцов
- 3 Общее время инкубаций: 90 минут при комнатной температуре (20-26°C/64-78,8°F)
- 4 Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- 5 Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- 6 Хранение: при 2-8°C/ 35-46°F, в оригинальных флаконах
- 7 Количество определений: 96 тестов.

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1 Аналитическая чувствительность

При тестировании буфера для образцов 30 раз данным методом Lamimin Ab ELISA аналитическая чувствительность составила 1.0 Ед/мл.

10.2 Специфичность и чувствительность

Лунки микропланшета покрыты нативными человеческими ламинином-1.

Не выявлено перекрестной реактивности с другими антигенами.

10.3 Линейность

Выбранные образцы сывороток были протестированы данным методом, и была показана линейность разведения. Однако, из-за гетерогенности человеческих аутоантител могут встречаться образцы, для которых разведение не будет линейным.

№ обра зца	развед ение	Измеренн ая концентр ация, Ед/мл	Ожидаем ая концентр ация, Ед/мл	Извлеч ение, (%)
1	1 / 100	169.0	165.0	102.4
	1 / 200	83.9	82.5	101.7
	1 / 400	40.4	41.3	97.8
	1 / 800	19.5	20.6	94.7
2	1 / 100	51.9	52.0	99.8
	1 / 200	24.0	26.0	92.3
	1 / 400	11.9	13.0	91.5
	1 / 800	6.8	6.5	104.6

10.4 Воспроизводимость

Воспроизводимость (внутри и между сериями) метода оценивали тестированием трех образцов сывороток с концентрациями, лежащими в диапазоне измеряемых значений.

внутри серии			между сериями		
№ образца	Среднее, Ед/мл	CV	№ образца	Среднее, Ед/мл	CV
1	175.0	5.1	1	170.0	4.8
2	56.0	4.5	2	52.0	5.5
3	18.0	5.4	3	21.0	3.8

10.5 Калибровка

Так как не существует Международного референсного стандарта, данный метод прокалиброван в условных единицах (Ед/мл).

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

Д.М.Н., профессор Долгов В.В.
2011г.

2011г.

Подпись: *Васильев В.В.*
устанавливаю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Государства
подпись: *Васильев В.В.*

Всего прошито

и пронумеровано

7 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.





ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения *Sphingomyelin – IgG/IgM*

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Sphingomyelin – GM предназначен для количественного и качественного определения IgG и/или IgM антител к сфингомиелину в человеческой сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием высокочистого сфингомиелина и нативного человеческого β 2-гликопротеина I. Эти антитела распознают специфические эпитопы комплекса, образованного сфингомиелином и β 2-гликопротеином I. Метод предназначен для диагностики и оценки риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом (APS).

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Антитела к сфингомиелину относятся к группе антифосфолипидных антител, направленных к липидным фосфолипидам, как кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, сфингомиелин и фосфатидиловая кислота. Фосфолипиды являются компонентами биологических мембран.

Антифосфолипидные антитела часто выявляются в сыворотке пациентов с системной красной волчанкой (SLE) и подобными заболеваниями. Присутствие антифосфолипидных антител у пациентов с SLE и другими подобными заболеваниями типично для вторичного антифосфолипидного синдрома (APS). И наоборот, присутствие антифосфолипидных антител у больных, не страдающих другими аутоиммунными заболеваниями свидетельствует о первичном APS.

Многие исследования показали наличие корреляции между этими антителами и повышенной смертностью тромбоза, тромбоцитопении и привычных выкидышей (в результате инфаркта миокарда). Точные механизмы по которым патогенные антифосфолипидные антитела индуцируют развитие тромбоза пока точно не установлены.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сывороток разводят в 101 раз и инкубируют в лунках микропланшета, покрытых специфическим антигеном.

Антитела, присутствующие в образцах сывороток пациентов, связываются с антигеном. Не связавшаяся фракция удаляется при последующей промывке. Вслед за промывкой в лунки добавляется конъюгат антител к иммуноглобулинам человека и пероксидазы хрена (конъюгат), который при дальнейшей инкубации взаимодействует с образовавшимся комплексом антиген-антитело, связанным в лунках микропланшета. Не связавшийся конъюгат удаляется при последующей промывке. Добавление субстрата ТМВ вызывает развитие ферментатической цветной (голубое окрашивание) реакции, которая останавливается добавлением разведенной кислоты (окраска меняется на желтую). Интенсивность окрашивания зависит от количества конъюгата, связавшегося с комплексом антиген-антитело в лунках микропланшета, и, таким образом, пропорционально исходной концентрации соответствующих антител в образцах сывороток пациентов.

3. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагенты, требующие разведения:	Набор
5х Буфер для образцов	96 тестов
	1 флакон

20 мл концентрата (5х) (белая крышка: желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	
50х Буфер для промывок 20 мл концентрата (50х) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: бесцветный раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарт Cut-off 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгаты 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) 15 мл IgM (зеленая крышка: зеленый раствор) Содержат: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	По 1 флакону
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12х8ми луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклопосуда (цилиндр 100 – 1000 мл), пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл), многоканальные пипетки (100 – 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

20 мл концентрата (5х) (белая крышка: желтый раствор) Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% (консервант)	
50х Буфер для промывок 20 мл концентрата (50х) (белая крышка: зеленый раствор) Содержит: Tris, NaCl, Tween 20, азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Реагенты, готовые к использованию:	
Отрицательный контроль 1.5 мл (зеленая крышка: бесцветный раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Положительный контроль 1.5 мл (красная крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарт Cut-off 1.5 мл (голубая крышка: желтый раствор) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	1 флакон
Стандарты По 1.5 мл в каждом: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность окраски усиливается с повышением концентрации: желтые растворы) Содержит: человеческую сыворотку (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант)	6 флаконов
Конъюгаты 15 мл IgG (голубая крышка: голубой раствор) 15 мл IgM (зеленая крышка: зеленый раствор) Содержат: антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена	По 1 флакону
Раствор ТМВ 15 мл (черная крышка) Содержит: стабилизированный раствор ТМВ/H ₂ O ₂	1 флакон
Стоп-раствор 15 мл (белая крышка: бесцветный раствор) Содержит: 1М соляную кислоту	1 флакон
Микропланшет 12х8ми луночных стрипов, покрытых см. параграф 1.	1 планшет

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, при возможности, фильтром сравнения 620 нм (600-690 нм). Стеклопосуда (цилиндр 100 – 1000 мл), пробирки для разведений. Вортекс миксер, калиброванные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл), многоканальные пипетки (100 – 1000 мкл). Ручное или автоматическое промывающее устройство (многоканальные пипетки или автоматическое устройство), фильтровальная бумага. Для данного набора необходимо использовать только очищенную воду, согласно определению данному в фармакопее США (USP 26 - NF 21) или фармакопее ЕС (Eur.Ph. 4th ed.).

4. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Храните микропланшет и весь набор при 2-8°C в оригинальных упаковках. После приготовления растворы стабильны в течение не менее одного месяца при 4°C/39°F. Реагенты и Микропланшет должны быть использованы до истечения срока годности, указанного на каждом компоненте. Не допускайте длительного пребывания раствора ТМВ на свету. Храните микропланшет в тщательно запечатанном алюминиевом пакете с осушителем.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

5.1 Опасность для здоровья

Данный продукт предназначен только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. Только сотрудники, специально обученные методам диагностики in vitro, могут выполнять тестирование данным методом. Хотя данный продукт не считается чрезвычайно токсичным или опасным при условии правильного использования, соблюдайте следующие рекомендации для наибольшей безопасности:

Рекомендации и предостережения

Данный набор содержит потенциально опасные компоненты. Реагенты набора не классифицированы как раздражающие вещества для глаз и кожи, но рекомендуется избегать контакта с глазами или кожей и используйте одноразовые перчатки. **ВНИМАНИЕ!** Стандарты, контроли и буферы содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. NaN_3 может быть токсичен при проглатывании или попадании на кожу или в глаза. NaN_3 может вступать в реакцию с медью и свинцом водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металла. При утилизации проливайте большим количеством воды для предотвращения накопления азидов металлов. Пожалуйста, выполняйте утилизацию в соответствии с CDC или другими локальными/национальными руководствами. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ. Не пипетируйте ртом.

Все материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе (для приготовления контролей, стандартов и т.д.) были протестированы признанными методами и получены отрицательные результаты на присутствие HbsAg, гепатита С и HIV 1. Однако ни один тест не может полностью гарантировать отсутствия вирусных агентов в таких материалах. Со всеми контролями, стандартами и образцами сывороток пациентов требуется обращаться как с материалами, могущими переносить инфекционные заболевания, согласно национальным требованиям.

5.2 Общие рекомендации по использованию

- Не смешивайте или не замещайте реагенты и микропланшеты из разных лотов. Это может приводить к отклонениям в результатах.
- Все компоненты должны достичь комнатной температуры ($20\text{--}32^\circ\text{C}/68\text{--}89.6^\circ\text{F}$) перед использованием, тщательно перемешайте и строго следуйте рекомендованной схеме инкубации, для получения оптимальных результатов тестирования.
- Инкубация: При использовании автоматических систем рекомендуется использовать температуру инкубации $30^\circ\text{C}/86^\circ\text{F}$.
- Никогда не нагревайте компоненты до температуры выше $37^\circ\text{C}/98.6^\circ\text{F}$.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата новыми одноразовыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света. Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, использованными для внесения другого реагента.
- Точный клинический диагноз не должен базироваться только на результатах данного теста, но должен быть сделан врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

6. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Предпочтительно тестировать свежесобранные образцы сывороток. Забор крови должен проводиться с соблюдением национальных требований.
- Не используйте желтушную, липемичную, гемолизную сыворотки или образцы с бактериальной контаминацией. Сыворотки с видимыми частицами должны быть очищены центрифугированием на низкой скорости ($<1000 \times g$). Образцы крови необходимо собирать в чистые, сухие и пустые пробирки. После отделения сыворотки, образцы должны быть протестированы немедленно или храниться в тщательно закрытых пробирках при $2\text{--}8^\circ\text{C}/35\text{--}46^\circ\text{F}$ до трех дней, или должны быть заморожены при $-20^\circ\text{C}/-4^\circ\text{F}$ для более длительного хранения.

7. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

7.1 Приготовления перед пипетированием

- Разведите концентрированные реагенты:
- Разведите концентрат буфера для образцов в 5 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 80 мл воды).
- Разведите концентрат буфера для промывок в 50 раз дистиллированной водой (например, 20 мл концентрата и 980 мл воды).
- Образцы
- Разведите образцы сывороток в 101 раз готовым буфером для образцов (1x), например, 1000 мкл буфера для образцов (1x) + 10 мкл сыворотки. Тщательно перемешайте!

Промывка

Приготовьте 20 мл разведенного буфера для промывок (1x) на 8 лунок или 200 мл для промывки 96 лунок. Например, 4 мл концентрата буфера для промывок плюс 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Рассчитайте избыточный объем, требуемый для установки инструмента и «мертвый» объем для автоматического пипетирования.

Ручная промывка:

Удалите полностью жидкость из лунок, перевернув микропланшет. Постучите перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Внесите по 300 мкл разведенного буфера для промывок в каждую лунку, подождите 20 секунд. Повторите всю процедуру еще два раза.

Микропланшет

Рассчитайте количество лунок, требуемое для текущего анализа. Удалите лишние лунки из держателя, поместите их в поставляемый пластиковый пакет с осушителем, тщательно закройте его и храните при 2-8°C/35-46°F

7.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Схема пипетирования приведена в приложении А, процедура теста описана в приложении В. Все образцы и стандарты рекомендуется анализировать в дублях. Стандарт Cut-off необходимо анализировать только при выполнении качественного анализа.

ЗАМЕЧАНИЕ: При параллельном определении IgG и IgM, все стандарты, контроли и образцы должны анализироваться дважды, отдельно для каждого класса иммуноглобулинов.

- Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца сыворотки пациента в предназначенные для образцов лунки.
- Внесите по 100 мкл стандартов ИЛИ контроля «cut-off» и отрицательного и положительного контролей в соответствующие лунки.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного 1:50).
- Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F).
- Промойте 3 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного 1:50).
- Внесите по 100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F), в темноте.
- Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор субстрата.
- Инкубируйте не менее 5 минут.
- Аккуратно перемешайте микропланшет в течение 5 секунд.
- Считайте абсорбцию при 450 нм (опционально при 450/620 нм) в течение 30 минут

8. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для количественной оценки постройте калибровочную кривую, откладывая оптическую плотность (ОП) каждого калибратора (по оси у) против соответствующих значений концентраций в Ед/мл (по оси х). Для получения наиболее качественных результатов рекомендуется использовать log/lin координаты и 4х-параметрическую аппроксимацию. Считайте концентрацию антител, выраженную в Ед/мл, используя ОП, полученную для каждого образца.

Нормальный диапазон	Сомнительные результаты	Положительные результаты
< 12 Ед/мл	12-18 Ед/мл	>18 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Стандарты рекомендуется пипетировать в дублях при каждой постановке.

Стандарты IgG/М	ОП 450/620 нм	CV % (отклонения)
0 Ед/мл	0.039	0.0
3 Ед/мл	0.156	1.4
10 Ед/мл	0.310	2.1
30 Ед/мл	0.615	1.8
100 Ед/мл	1.253	2.9
300 Ед/мл	2.091	0.8

Пример расчетов:

Пациент	Дубли (ОП)	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P01	1.841/1.833	1.834	219.4
P02	0.596/0.563	0.580	27.1

Специфические для лота данные приведены в прилагаемом к набору листе контроля качества. Медицинские лаборатории могут проводить внутренний контроль качества, используя свои собственные контроли и/или приготовленные в лаборатории пулы сывороток, как предусмотрено руководством EU. Не используйте данный пример для расчета результатов тестирования образцов сывороток пациентов!

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений, основываясь на использовании собственной технологии, контролях, оборудовании и популяции, согласно собственным установленным процедурам.

Для качественного определения считайте ОП образцов и контроля «cut-off». Сравните ОП, полученную для образцов сывороток пациентов, и ОП контроля «cut-off». При интерпретации качественного анализа рекомендуется считать сомнительными результаты, попадающие в диапазон $\pm 20\%$ от значения стандарта cut-off. Все образцы, ОП которых выше данного диапазона, являются положительными, а все образцы, ОП которых ниже данного диапазона, являются отрицательными.

Отрицательный: ОП пациента $< 0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Сомнительный: $0.8 * \text{ОП контроля «cut-off»} < \text{ОП пациента} < 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

Положительный: ОП пациента $> 1.2 * \text{ОП контроля «cut-off»}$

9. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Материал образца: сыворотка
- Объем образца: 10 мкл образца, разведенного в 101 раз готовым буфером для образцов
- Общее время инкубации: 90 минут при комнатной температуре (20-32°C/68-89.6°F)
- Диапазон калибровочной кривой: 0-300 Ед/мл
- Аналитическая чувствительность: 1.0 Ед/мл
- Хранение: при 2-8°C/35-46°F, только в оригинальных флаконах
- Количество определений: 96 определений

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Аналитическая чувствительность

Тестирование буфера для образцов данным методом 30 раз показало аналитическую чувствительность метода 1.0 Ед/мл

10.2 Специфичность и чувствительность

Микропланшет покрыт высокочистым фосфатидилхолином и нативным человеческим $\beta 2$ -гликопротеином I

Не выявлено перекрестной реактивности с другими аутоантигенами.

10.3 Линейность

Образцы сывороток были протестированы данным методом и была показана линейность разведения. Однако из-за гетерогенной природы человеческих аутоантител могут встречаться образцы, которые не подчиняются этому правилу.

№ образ	Коэф. разведе	Изменен ная	Ожидаем ая	Извлечен ие (%)
1	1/100	181.0	185.0	97.8
	1/200	90.4	92.5	97.7
	1/400	44.6	46.3	96.3
	1/800	22.1	23.1	95.7
2	1/100	87.0	88.0	98.9
	1/200	45.6	44.0	103.6
	1/400	23.0	22.0	104.5
	1/800	12.0	11.0	109.0

10.4 Точность и воспроизводимость

Для определения воспроизводимости метода, внутри серии и между сериями, были протестированы три образца сывороток с концентрациями в диапазоне калибровочной кривой.

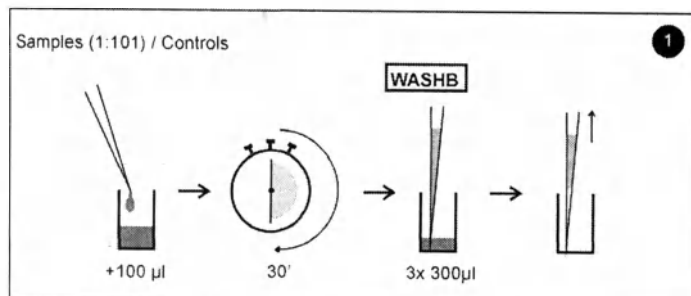
внутри серии		
№ образ	Средн	CV (%)
1	189.0	3.1
2	85.0	4.3
3	33.0	2.8

между сериями		
№ образ	Средн	CV (%)
1	185.0	4.1
2	82.0	5.1
3	35.0	3.8

10.5 Калибровка

Из-за отсутствия международных референсных стандартов данный метод прокалиброван в условных единицах (Ед/мл).

Приложение А: Схема пипетирования



Рекомендуется пипетировать стандарты, контроли и образцы следующим образом:

Для количественной оценки используйте стандарты для построения калибровочной кривой.

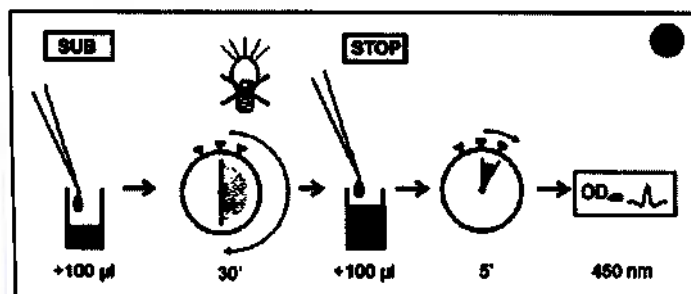
Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off».

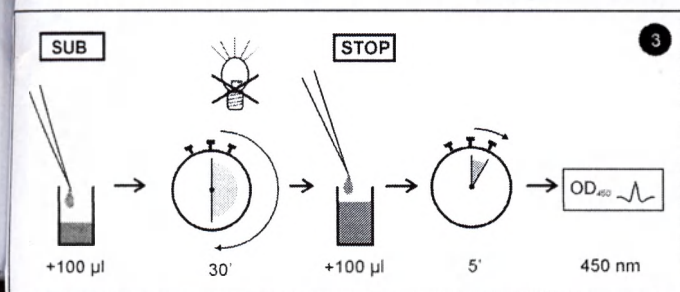
Для количественной оценки используйте стандарты для						
	1	2	3	4	5	6
A	CalA	CalE	P1			
B	CalA	CalE	P1			
C	CalB	CalF	P2			
D	CalB	CalF	P2			
E	CalC	PC	P3			
F	CalC	PC	P3			
G	CalD	NC				
H	CalD	NC				

Для качественной оценки используйте стандарт «cut-off»						
	7	8	9	10	11	12
A	NC	P2				
B	NC	P2				
C	CC	P3				
D	CC	P3				
E	PC					
F	PC					
G	P1					
H	P1					

CalA: стандарт A,
 CalB: стандарт B,
 CalC: стандарт C,
 CalD: стандарт D,
 CalE: стандарт E,
 CalF: стандарт F
 PC: положительный контроль
 NC: отрицательный контроль
 CC: стандарт «Cut-off»
 P1: образец сыворотки 1-го пациента
 P2: образец сыворотки 2-го пациента
 P3: образец сыворотки 3-го пациента

Приложение В: Процедура анализа





«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения 17-ОН-Progesteron
17-ОН-прогестерон

Иммуноферментный набор для in vitro количественного определения 17-ОН-прогестерона в человеческой сыворотке или плазме

1. Назначение

Данный набор содержит реагенты для количественного определения 17-ОН-прогестерона (17-ОНР) в сыворотке или плазме.

Только для диагностики in vitro.

2. Введение

Стероидный гормон 17-ОН-прогестерон (17-ОНР) продуцируется в коре надпочечников и гонадах. Гестагенные эффекты 17-ОНР незначительны. Однако, определение этого гормона клинически значимо, так как он является последним предшественником 11b-дезоксикортизола (CpS). CpS образуется при гидроксилировании атома углерода C21. Ферментативную активность 21-гидроксилазы в коре надпочечников можно оценивать путем определения уровня 17-ОНР в кровотоке.

Дефициты 21-гидроксилазы, чаще всего выявляемые при врожденной гиперплазии надпочечников, приводят к избыточной секреции 17-ОНР и, как следствие, увеличению его уровня в кровотоке. Дефициты 21-гидроксилазы, однако, приводят лишь к умеренному повышению значений 17-ОНР. Таким образом определение этого гормона может быть использовано в дифференциальной диагностике врожденной гиперплазии надпочечников.

У взрослых небеременных женщин уровень 17-ОНР в крови зависит от фазы менструального цикла. Как прогестерон, 17-ОНР секретируется зрелыми фолликулами и желтым телом. Уровень обычно выше после овуляции. Кроме того, уровень 17-ОНР имеет циркадный ритм, который коррелирует с секрецией кортизола надпочечниками. Максимальный уровень обнаруживается в образцах, собранных в интервале между полуночью и 8.00 утра.

У взрослых мужчин есть только небольшое количество данных таких флуктуаций концентрации 17-ОНР.

Во время беременности большое количество 17-ОНР продуцируется в плоде, плаценте и коре надпочечников.

Гормон секретируется в кровоток матери и плода. Концентрация 17-ОНР у матери сильно повышена после 32 недели беременности, и достигает 4х кратного повышения по сравнению с лютеиновой фазой цикла. 17-ОНР также может выявляться в пуповине у новорожденного.

3. Принцип метода

Данный набор 17-ОНР ELISA основан на твердофазном иммуно-ферментном анализе (ELISA), с использованием конкурентного связывания. 17-ОНР, присутствующий в образце, конкурирует с фиксированным количеством 17-ОНР, конъюгированного с пероксидазой хрена, за связывание с

антителами, сорбированными в лунках микропланшета. После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. Количество связавшегося фермента обратно пропорционально концентрации 17-ОНР в образце. После внесения субстрата, интенсивность развившегося голубого окрашивания обратно пропорциональна количеству 17-ОНР, присутствующих в образце. Результаты могут быть считаны непосредственно из калибровочной кривой.

4. Меры предосторожности

1. Использовать только для диагностики *in vitro*.

Набор предназначен только для профессионального использования.

2. Внимательно прочитайте инструкцию перед использованием. Используйте действующую версию ИНСТРУКЦИИ, поставляемую с набором. Убедитесь, что вся ИНСТРУКЦИЯ понятна. Более подробную информацию (клиническое обоснование, характеристики набора, протоколы для автоматизированных систем, варианты применения, литература по теме и т.д.) можно получить, обратившись на www.IBL-Hamburg.com

3. В случае серьезного повреждения упаковки набора обращайтесь к производителю или дистрибьютору, в письменной форме, не позднее чем через одну неделю после получения набора. Не используйте поврежденный набор, сохраните его для дальнейших действий, связанных с рекламацией.

4. Соблюдайте правила, установленные для лотов и срока годности наборов. Не смешивайте реагенты из разных лотов. Не используйте реагенты после истечения срока годности.

5. Соблюдайте принятые в Вашей лаборатории национальные правила безопасности. Надевайте лабораторную одежду, одноразовые латексные перчатки и защитные очки, когда это необходимо. Микробное загрязнение реагентов или образцов может привести к ложным результатам.

6. Реагенты, поставляемые в этом наборе, содержат опасные вещества, которые могут вызвать раздражение глаз и кожи. В главе «РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА» и на этикетках флаконов приведена более подробная информация. Инструкцию по мерам безопасности при работе с этими материалами можно получить по запросу непосредственно в компанию IBL или на интернет-странице IBL.

7. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми. При контакте промойте бактерицидным мылом и смойте большим количеством воды. Нельзя курить, принимать пищу, пить и пользоваться косметикой в комнате, где работают с образцами и реагентами набора. Все компоненты крови и биологические материалы могут быть потенциально опасны. С данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом, следуя установленным инструкциям и правилам.

8. Избегайте контакта со стоп-раствором. Он может вызвать раздражение и ожоги кожи.

9. Все реагенты набора, содержащие компоненты человеческого происхождения (сыворотку или плазму), были протестированы на ВИЧ I/II, HBsAg и HCV и дали отрицательный результат. Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Набор должен храниться при температуре 2-8°C. Микропланшет должен храниться в плотно закрытом пакете при температуре 2-8°C.

При хранении при 2-8°C не вскрытые набор стабилен до истечения срока годности. Не используйте набор после истечения срока годности.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микропланшет должен храниться при 2-8°C.

Микропланшет должен храниться в плотно закрытом пакете.

Вскрытый набор сохраняет активность в течение 6 недель при соблюдении условий хранения, описанных выше.

6. Сбор и хранение образцов

Соберите кровь обычной венопункцией, соблюдая принятые меры предосторожности. Очень важно обеспечивать сохранность образцов с момента забора крови и до анализа. Не используйте образцы с гемолизом, липемией, желтухой. Мутные образцы необходимо центрифугировать перед тестированием для удаления частиц.

Хранение:	2-8°C	≤ -20°C (аликваты)	Хранить в месте, защищенном от нагревания или попадания прямых солнечных лучей. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.
Стабильность:	7 дней	3 месяца	

7. Компоненты набора

Количество	Обозначение	Компонент
1 x 12x8	MTP	Микропланшет. Отдельные стрипы, «ломаемые», покрытые козьими поликлональными анти-кроличьими антителами (IgG), антисывороткой к 17-ОНР
1 x 20 мл	ENZCO NJ	Конъюгат фермента, окрашен в желтый цвет. Готов к использованию. Содержит 17-ОНР, конъюгированный с пероксидазой хрена (17-ОНР:HRP), фосфатный буфер, стабилизаторы.
1 x 2.0 мл 6 x 0.5 мл	CAL A-G	Стандарты A-F: 0; 0.15; 0.5; 1.5; 3.0; 7.5; 20 нг/мл 0.45; 1.5; 4.5; 9.1; 22.7; 60.6 нмоль/л Готовы к использованию. Стандарт А = нулевой стандарт (сыворотка, не содержащая стероидов). Содержит: 17-ОН-Р, человеческую сыворотку, стабилизаторы.
2 x 0,5 мл	CONTR OL 1+2	Контроли 1+2 Готовы к использованию. Концентрации/допустимый диапазон указан в сертификате контроля качества (QC)
1 x 50 мл	WASHB UF CONC	Буфер для промывок, концентрат (20х). Содержит фосфатный буфер, твин, стабилизаторы.
1 x 12 мл	TMB SUBS	Раствор субстрата ТМВ. Готов к использованию. Содержит: ТМВ, буфер, стабилизаторы.
1 x 12 мл	TMB STOP	ТМВ стоп-раствор. Готов к использованию. Содержит 1 М H2SO4.
3 x	FOIL	Адгезивная пленка

8. Необходимые материалы, не поставляемые с набором:

Калиброванные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками (< 3% CV). Объемы: 5; 25; 50; 100; 500 мкл.

Орбитальный встряхиватель (200-900 об.)

Вортекс

8-канальная пипетка и резервуары для реагентов

Бутыль для приготовления промывочного буфера, ручное или автоматическое промывающее устройство

Микропланшетный ридер с возможностью измерения поглощения при длине волны 450 нм (по возможности – с фильтром сравнения 600-650)

Бидистиллированная или деионизированная вода.
Фильтровальная бумага, сменные наконечники, таймер.

9. Замечания по процедуре метода:

1. Любое несоответствующее обращение с образцами или какое-либо изменение процедуры анализа может повлиять на результаты. Указанные для пипетирования объемы, время инкубаций, температура и шаги, которые необходимо произвести до начала анализа, должны быть выполнены в точности, как это описано в данной инструкции. Используйте только калиброванные пипетки и оборудование.
2. После начала анализа все этапы должны выполняться без перерывов. Убедитесь, что приготовлены все необходимые реагенты, образцы и оборудование находится в рабочем состоянии и готово к использованию. Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием (18-25 °C). Аккуратно вращая, перемешайте каждую пробирку и каждый флакон с жидким реагентом или образцом перед анализом. Перемешивайте реагенты, избегая образования пены.
3. Не допускайте контаминации реагентов, пипеток, лунок и пробирок. Используйте новый одноразовый наконечник для каждого реагента, стандарта и образца. Не меняйте крышки флаконов. Всегда закрывайте не используемые флаконы. Не используйте повторно реагенты, пробирки и лунки.
4. Рекомендуется исследовать образцы в дублях, так, чтобы было возможно выявить потенциальные ошибки пипетирования.
5. Используйте схему пипетирования для контроля соответствующего плана анализа.
6. Время инкубации влияет на результаты. Все лунки должны обрабатываться в одной последовательности, с одинаковой скоростью. Рекомендуется использовать 8-канальную пипетку для внесения растворов в лунки.
7. Промывка лунок – это очень важный этап. Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Для промывок рекомендуется использовать многоканальную пипетку или автоматическую промывающую систему. Не допускайте высыхания ячеек между инкубациями. Не царапайте лунки во время внесения или аспирации растворов. Вносите и удаляйте растворы аккуратно. При промывках следите, чтобы все лунки заполнялись промывочным буфером, а затем промывочный буфер полностью удалялся из лунок.
8. Влажность влияет на пробирки и покрытые лунки. Не открывайте пакет с микропланшетными стрипами, пока он не достигнет комнатной температуры.
Не использованные стрипы немедленно верните обратно в пакет с осушителем и тщательно закройте.

10. Приготовление Образцов и Реагентов

10.1 Приготовление лиофилизированных и концентрированных компонентов.

Разведение/растворение	Компонент		Разбавитель	Соотношение	Примечания	Хранение	Стабильность
15 мл	Буфер для пр	до 300 мл	Бидистиллированная вода	1:20		2-8°С	4 недели

	ОМ						
	ЫВ						
	ОК						

10.2. Разведение образцов

Образцы с предполагаемой концентрацией аналита выше уровня самого высокого стандарта должны быть разведены стандартом А.

11. Процедура анализа.

1	Внесите по 25 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки микропланшета.
2	Внесите по 200 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
3	Закройте планшет адгезивной пленкой, аккуратно шейкируйте, инкубируйте 60 минут при комнатной температуре (18-25°C).
4	Удалите адгезивную пленку. Слейте инкубационный раствор. Промойте лунки 3 раза по 250 мкл разведенным рабочим буфером. Удалите остатки жидкости, постучав перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге.
5	При добавлении субстратного раствора и стоп-раствора используйте, если возможно, 8-ми канальную пипетку. Субстратный раствор и стоп-раствор должны быть добавлены во все лунки в одном порядке и с одинаковой скоростью. Используйте прямое дозирование и избегайте образования пузырей в лунках.
6	Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ в каждую лунку.
7	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (18-25°C).
8	Остановите реакцию добавлением 100 мкл ТМВ стоп-раствора в каждую лунку. Коротко перемешайте содержимое лунок аккуратно покачивая микропланшет..
9	Измерьте оптическую плотность с помощью фотометра при 450 ± 10 нм (длина волны сравнения 600-650 нм) в течение 30 минут после добавления стоп-раствора. При измерении в лунках не должно быть пузырей.

12. Контроль качества

Результаты анализа являются достоверными только в том случае, если были полностью соблюдены все этапы, описанные в данной инструкции. Кроме того, пользователи должны строго придерживаться правил безопасности и других соответствующих инструкций, установленных в лаборатории. Результаты измерений всех стандартов и контролей, поставляемых с набором, должны попадать в диапазоны допустимых значений, указанных на этикетках флаконов. Если данные критерии не выполнены, постановка считается не действительной и анализ должен быть выполнен еще раз. Каждая лаборатория должна использовать образцы с известными значениями в качестве дополнительного контроля.

В случае каких-либо отклонений должны быть проверены следующие технические параметры:

- срок годности реагентов (приготовленных)
- условия хранения
- пипетки, оборудование
- условия инкубаций
- качество промывок.

Рекомендуется участвовать в соответствующих программах внешнего контроля качества.

13. Подсчет Результатов

Для получения калибровочной кривой используйте либо автоматический, либо ручной метод расчетов. Для ручного метода на полулогарифмической бумаге постройте график зависимости полученных оптических плотностей Стандартов (ось у, линейная шкала) от концентрации соответствующих Стандартов (ось х, логарифмическая шкала). При автоматических расчетах хорошее соответствие получается при использовании методов кубического сплайна, 4х параметрической регрессии или Logit-Log.

Для расчета калибровочной кривой используйте каждое значение, полученное для стандартов (если значение одного из дублей, полученных для каждого стандарта, резко выпадает, его можно не использовать и учитывать только другое значение).

Концентрацию аналита в образцах можно определить непосредственно из соответствующей калибровочной кривой.

В случае разведения образцов, полученное в результате измерения значение необходимо умножить на коэффициент разведения.

Образцы, для которых были получены значения ОП, превышающие ОП наибольшего стандарта, должны быть разведены, как это описано в п. «Разведение образцов» и проанализированы еще раз.

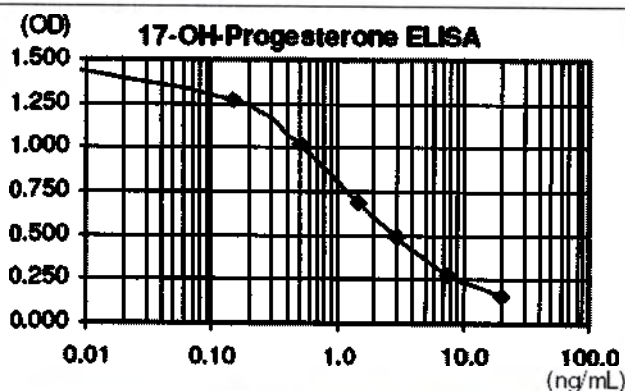
Преобразование:

17-ОНР (нг/мл) $\times$ 3.03 = пмоль/л

Типичная калибровочная кривая:

(Пример. Не использовать для реальных расчетов!)

Стандарт	17-ОНР (нг/мл)	Среднее, ОП	ОП/ОП _{max} , (%)
A	0.00	1.487	100.00
B	0.15	1.276	85.80
C	0.50	1.015	68.30
D	1.50	0.691	46.50
E	3.00	0.496	33.30
F	7.50	0.274	18.40
G	20.00	0.152	10.20



14. Ожидаемые значения

Сами по себе в отдельности результаты не могут служить единственной причиной какого-либо терапевтического заключения. Они должны коррелировать с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами.

Исследования, проведенные с участием практически здоровых людей, показали приведенные ниже уровни:

17-ОНР (нг/мл)						
Женщины				Мужчины		
Фаза	среднее	диапазон	N	среднее	диапазон	N
		н			н	
Фолликулярная	0.51	0.3 – 1.0	16	0.75	0.05 - 1.6	48
Лютеиновая	0.96	0.2 - 2.9	16			
После стимуляции АСТН	1.4	< 3	17			
Беременность, 3 триместр	9.1	1.8 – 20.0	52			

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений.

15. Ограничения метода

Нижеперечисленные компоненты крови не оказывали значительного эффекта на результаты тестирования (+/- 20 % от ожидаемого) вплоть до указанных концентраций:

Гемоглобин	8.33 мг/мл
Билирубин	0.33 мг/мл
Триглицериды	0.25 мг/мл

16. Характеристики метода

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)	Вещество	Перекрестная реактивность (%)	% перекрестной реактивности с другими тестированными веществами < 0.001 %
	17а-ОН-прегненолон	1.7	
	прогестерон	1.4	
	11-дезоксикортизол	1.3	
	дезоксикортикостерон	0.12	
	Кортизол	0.013	
	Прегненолон	0.012	
Аналитическая чувствительность (предел определения)	0,03 нг/мл	Среднее значение нулевого стандарта - 2SD	
Воспроизводимость	Диапазон (нг/мл)	CV (%)	
	2.44 – 11.41	2.8 – 4.9	

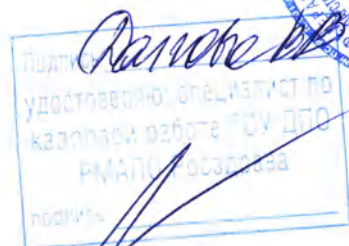
серии			
Между сериями	0.26 – 5.74	5.8 – 9.2	
Линейность	Диапазон (нг/мл)	Серийные разведения до	Диапазон (%)
	1.56 – 9.23	1:16	80 - 120
Извлечение	Mean (%)	Диапазон (%)	% Извлечения после насыщения
	101	80 - 121	
Сравнение методов (данный метод и IBL RIA)	IBL ELISA = 1.01 x IBL RIA + 4.6		r = 0.98; n = 50
Сравнение методов (данный метод и другой RIA)	IBL-Assay = 1.31 x GCMS – 0.45		r = 0.94; n = 22

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



Д.М.Н., профессор Долгов В.В.

« _____ » _____ 2011г.

Всего прошито
и пронумеровано
8 листов

Генеральный Директор
ЗАО "БиоХимМак"
Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
Директор

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения Renin (active)

IBL Ренин ИФА является иммуноферментным тестом для количественного измерения *in vitro* активного Ренина в ЭДТА-плазме человека.

Измерения ренина используются в диагностике и обработке определенных типов гипертонии.

Резюме и Объяснение

Ренин – это фермент (м.в. 37 кДа), который принадлежит семейству протеаз аспарагиновой кислоты. Ренин принадлежит ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (РААС (RAAS)), которая регулирует кровяное давление, почечный кровоток, клубочковую фильтрацию, и калиево-натриевый гомеостаз.

Ренин продуцируется в виде проренина, неактивного предшественника, состоящего из 386 аминокислотных остатков, в юктагломерулярных клетках почки (1). Активный ренин может либо высвобождаться из клеточного депо, либо вновь образовываться в результате отщепления пептида 48 а.к.о. с N-конца молекулы проренина (2,3), в ответ на низкое внутрипочечное кровяное давление, уменьшенную реабсорбцию натрия, гипокалиемию или активность симпатической нервной системы.

Секреция проренина в кровь непрерывна, в отличие от строго контролируемого высвобождения ренина. Концентрация в крови проренина приблизительно в 100 раз выше, чем активного ренина (4,5). После высвобождения и активации, растворенный ренин способствует расщеплению α 2-глобулина ангиотензиногена в пептид-предшественник ангиотензин I, который полностью перерабатывается ангиотензинпревращающим ферментом (АПФ, (ACE)) в октапептид ангиотензин II. Все действия ангиотензина II опосредованы рецепторами G-белок-ангиотензин 1 типа (AT1) и ангиотензин 2 типа (AT2) (6). Прямые физиологические эффекты Ангиотензина II включают сужение сосудов, увеличение канальцевой реабсорбции натрия и хлоридов, удержания воды и высвобождение гормонов: альдостерона из коры надпочечников, антидиуретического гормона (АДГ (ADH), Вазопрессин) из задней доли гипофиза и адренокортикотропного гормона (АКТГ (ACTH), Кортикотропин) из передней доли гипофиза. Выпуск этих гормонов способствует удержанию натрия и секреции калия/Н⁺ в почке, усиливая таким образом чувство жажды и желание употребить соль через субфорникальный орган мозга (7,8). В отрицательной петле обратной связи секреция ренина уменьшается высокой концентрацией ангиотензина II (9), а выпуск альдостерона снижается уменьшением калия (10). Несмотря на действия растворенного ренина, закрепление ренина и проренина на мембранный рецептор ренина АТР6АР2 в мозге, сердце, плаценте, печени, почках и поджелудочной железе увеличивает эффективность расщепления ангиотензина и вызывает независимые от ангиотензина внутриклеточные эффекты, мобилизируя киназы, активизированные митогеном, ERK1 и ERK2 (11).

Плазменный ренин - хороший показатель деятельности РААС. В случае дисфункции РААС анализ Ренина дает клинические значения для диагноза, обработки и последующих действий.

Активный ренин должен быть измерен при:

Диагностике гипертонии (высокое кровяное давление: если диастолическое кровяное давление > 90 мм Hg и систолическое кровяное давление > 140 мм Hg; директива европейского Общества Кардиологии и европейского Общества Гипертонии)

Дифференциальной диагностике гиперальдостеронизм (первичный гиперальдостеронизм, вторичный гиперальдостеронизм с или без гипертензии, псевдогиперальдостеронизм)

Диагностике изолированного дефицита минерал-кортикоидов

Дифференциальной диагностике (вторичный гиперальдостеронизм или первичный гиперминералкортицизм)

Обнаружение Ренин-продуцирующих опухолей в почке

Контроле глюкокортикоидной терапии

Диагнозе недостаточного ответа на противогипертензионное лечение.

ПРИНЦИП теста

Набор IBL Ренин ИФА является твердо-фазным, меченым ферментом, иммуносорбентным анализом (ELISA) основанным на принципе сэндвича.

Микротитровальные лунки покрыты моноклональным мышинным антителом, направленным к уникальному антигенному участку человеческой активной молекулы Ренина. Аликвота образца пациента, содержащего эндогенный Ренин, инкубируется в покрытой лунке вместе с Буфером Анализа. После инкубации несвязанные компоненты вымываются. Наконец, добавляется Ферментный Конъюгат, который является анти-ренин моноклональным антителом, сопряженным с пероксидазой хрена, и после инкубации несвязанный ферментный конъюгат вымывается.

Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации Ренина в образце.

После добавления раствора субстрата интенсивность образовавшегося окрашивания пропорциональна концентрации активного Ренина в образце пациента.

Предупреждения и Предосторожности

Только для диагностического использования *in vitro*. Только для профессионального использования.

Все реактивы этого тест-набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, были проверены и подтвердили отрицательный результат для ВИЧ I/II, HBsAg и ВГС по методам, одобренным FDA. Все реактивы, тем не менее, должны использоваться как потенциально биологически опасные в использовании и для утилизации.

Прежде, чем начать тест, полностью и внимательно прочитайте инструкции. Используйте действительную версию вложения, предоставленную в наборе. Убедитесь, что все понятно.

Микроплашка содержит отщелкивающиеся стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 - 8 °C в запечатанном фольгированном мешочке и использоваться в поставляемом держателе.

Пипетирование образцов и реактивов должно быть сделано как можно быстрее и в той же самой последовательности для каждого шага.

Используйте емкости только для единственных реактивов. Это особенно относится к флаконам субстрата. Используя емкость для того, чтобы распределить раствор субстрата, которая ранее использовалась для раствора конъюгата, может окрасить раствор. Не переливайте реактивы назад в пузырьки, поскольку может получиться контаминация реактива.

Смешайте содержание лунок микроплашки полностью, чтобы гарантировать хорошие результаты испытаний. Не используйте микролунки повторно.

Не позволяйте лункам высыхать во время испытания; добавляйте реактивы немедленно после завершения шагов промывки.

Позвольте реактивам достигать комнатной температуры (21-26°C) прежде, чем начать тест. Температура повредит считыванию абсорбции анализа. Однако значения для образцов пациента не будут повреждены.

Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реактивов и анализов с кожей и слизистыми.

Не курите, не ешьте, не пейте, не наносите косметику в местах проведения анализа.

Носите одноразовые латексные перчатки, обращаясь с реактивами. Микробное загрязнение реактивов или анализов может дать ложные результаты.

Обращаться с продуктом следует в соответствии с процедурами, определенными соответствующим национальным регламентом по обращению с продуктами, представляющими биологическую опасность, или другими нормативными актами.

Не используйте реактивы после даты окончания срока действия указанной на ярлыках набора. Все указанные объемы должны быть выполнены согласно протоколу. Оптимальные результаты испытаний могут быть получены только при использовании откалиброванных ридеров и пипеток. Не смешивайте, не используйте изделия от наборов разных лотов. Рекомендуется не менять лунки различных плашек, даже той же самой партии.

Избегайте контакта со Стоп-раствором, содержащим 0,5 М H_2SO_4 . Он может вызвать раздражение кожи и ожоги.

Некоторые реактивы содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ как консерванты. В случае контакта глазами или кожей, немедленно смойте с водой.

Субстрат ТМБ имеет раздражающий эффект на кожу и слизистую оболочку. В случае возможного контакта, промойте глаза большим объемом воды, а кожу - с мылом и большим количеством воды. Вымойте загрязненные объекты прежде, чем повторно использовать их. При вдыхании, доставьте пострадавшего человека на открытый воздух.

Химические вещества и готовые или используемые реактивы должны расцениваться как опасные отходы согласно национальной инструкции по технике безопасности биологической или другим нормотивам.

Для информации относительно опасных веществ, включенных в набор, пожалуйста, посмотрите Сертификат Безопасности. Сертификат Безопасности для этого продукта находятся в каждом наборе.

Реактивы

Реактивы, поставляемые с набором

Микротитровальные лунки, 12x8 (ломаются обособленно), стрипы, 96 лунок;

Лунки покрыты антителами к Ренину человека (моноклональными).

Стандарт (Стандарт 0-5), 6 пузырьков, (лиофилизированных); 1 мл

Концентрации: 0; 4; 16; 32; 64; 128 пг/мл

Стандарты откалиброваны по 1-ый Международному стандарту ВОЗ для Ренина 68/356

см. „Подготовка Реактивов“

Содержит нертутный консервант.

Контроль Низкий и Высокий, 2 пузырька, (лиофилизированные); 1 мл

см. „Подготовка Реактивов“

Значения контроля и диапазоны указаны на ярлыках пузырька или QC-таблице.

Содержит нертутный консервант.

Анализ Буфер, 1 пузырек, 20 мл, готовых к использованию,

Содержит нертутное консервирующее средство.

Ферментный Конъюгат, 1 пузырек, 14 мл, готовых к использованию,

антитела к Ренину человека (моноклональные); конъюгированные с Пероксидазой Хрена.

Содержит нертутный консервант.

Раствор Субстрата, 1 пузырек, 14 мл, готовых к использованию,

Тетраметилбензидин (ТМБ).

Стоп - раствор, 1 пузырек, 14 мл, готовых к использованию,

содержит 0,5 М H_2SO_4 ,

Избегайте контакта со стоп-раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.

Промывочный Раствор, 1 пузырек, 30 мл (40X концентрат),

см. „Подготовку Реактивов“.

Внимание: Дополнительный Буфер Анализа для разбавления образцов доступен по запросу.

Требуемые материалы, не поставляемые в наборе

Микропланшетный откалиброванный ридер (450 ± 10 нм).

Откалиброванные микропипетки переменной точности.

Абсорбирующая бумага.

Дистиллированная или деионизированная вода

Таймер

Полулогарифмическая миллиметровка или программное обеспечение для сжатия данных

Условия Хранения

При хранении при 2 – 8 °C не вскрытые реактивы сохраняют реакционную способность до конца срока годности. Не используйте реактивы после этой даты.

Открытые реактивы должны храниться 2 – 8 °C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2 – 8 °C. Как только мешок фольги был открыт, надо позаботиться, чтобы сильно его закрыть снова.

Открытые наборы сохраняют активность в течение шести недель, при условиях хранения, описанных выше.

Подготовка Реактивов

Доведите все реактивы и требуемое количество стрипов до комнатной температуры перед использованием.

Стандарты

Восстановите лиофилизированное содержимое пузырька стандарта с 1 мл Водой дест. и дайте постоять в течение 10 минут минимум. Смешайте стандарты несколько раз перед использованием.

Внимание!: Восстановленные стандарты стабильны в течение 2 дней при 2 – 8 °C. Для более длительного хранения замораживать до -20 °C

Контроли

Восстановите лиофилизированное содержимое пузырька стандарта с 1 мл Водой дест. и дайте постоять в течение 10 минут минимум. Смешайте контроли несколько раз перед использованием.

Внимание!: Восстановленные контроли стабильны в течение 2 дней при 2 – 8 °C. Для более длительного хранения замораживать до -20 °C.

Промывочный Раствор

Добавьте деионизированную воду к 40X концентрату Промывочного Раствора. Разбавьте 30 мл концентрированного Раствора Промывки с деионизированной водой 1170 мл до финального объема 1200 мл.

Разбавленный Раствор Промывки устойчив в течение 2 недель при комнатной температуре.

Утилизация Набора

Утилизация набора должна быть сделана согласно национальным инструкциям. Специальная информация для этого продукта дана в Сертификате Безопасности.

Поврежденные Тест-Наборы

В случае обнаружения любого тяжелого повреждения набора или его компонентов, нужно немедленно сообщить в письменной форме. Крайний срок рекламации составляет две недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться при анализе. Они должны храниться, пока не будет найдено окончательное решение. После этого они должны быть утилизированы согласно официальным инструкциям.

Отбор и Подготовка проб

Только ЭДТА-плазма может использоваться в этом испытании.

Не используйте гемолизированные, желтушные или жирные образцы.

Пожалуйста, имейте в виду: Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в данном тесте.

Условия, в которых собраны образцы, нужно тщательно контролировать, так как много физиологических факторов могут влиять на секрецию ренина. Они включают:

Осанка: пациент, должно лежал больше 1 часа или стоял вертикально больше 1 часа

Ежедневные колебания Ренина: осуществление выборки должно быть сделано между 7:00 и 10:00 если возможно.

Диета: содержание натрия в диете должно быть известно и в конечном счете проверено измерением натриурии в течение 24 часов

Лечение: уровень активного ренина может быть вызван гипотензивным лечением (например, мочегонные средства, ингибиторы АХЭ, бета адренергические блокаторы, или сосудорасширяющие средства)

Беременность: уровень неактивного и активного ренина увеличивается во время беременности

Менструальный цикл: уровень активного ренина увеличен на второй фазе цикла (осуществление выборки должно быть сделано по возможности во время первой фазы),

Возраст: активный уровень ренина уменьшается с возрастом

ВНИМАНИЕ!:

Сыворотки от раковых пациентов могут содержать увеличенные уровни Ренина.

Отбор Проб

Плазма ЭДТА

Целая кровь должна быть собрана в пробирки центрифуги, содержащие анти-коагулянт, и немедленно после отбора отцентрифугироваться.

(Например, для плазмы ЭДТА Серштедт-Моноветт – красный колпачок - №02.166.001)

Хранение Анализа и Подготовка

Анализы должны быть закрыты и храниться при комнатной температуре. НЕ хранить при 2-8°C до обработки, так как в температурном диапазоне 2-8°C может произойти криоактивация проренина, дающая ложноположительные значения активного ренина (12,13).

Если образцы не могут быть протестированы в течение 4 часов после первичного отбора, хранить замороженными при -20°C или ниже. Рекомендуется быстро заморозить и разморозить обработанные образцы, избегая температурного диапазона 2-8°C. Для быстрых замораживающих процедур может использоваться твердая углекислота/этиленовая ванна.

Разбавление Образцов

Если в начальном испытании, образцы имеют значения больше, чем самый высокий стандарт, они могут быть разбавлены Буфером Анализа и повторно проанализированы, как описано в "Процедуре Анализа". Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

Пример:

а) разбавление 1:2: 75 мкл образцов + 75 Буфера Анализа мкл (смешиваются полностью),

б) разбавление 1:5: 30 мкл образцов + 120 Буфера Анализа мкл (смешиваются полностью).

Процедура Анализа

Общие Замечания

Перед использованием все реактивы и образцы нужно довести до комнатной температуры. Все реактивы должны быть смешаны без вспенивания.

Как только тест был начат, все шаги должны быть закончены без прерывания.

Используйте одноразовые новые пластмассовые наконечники пипетки для каждого стандарта, контроля или образца, чтобы избежать взаимного загрязнения.

Абсорбция - функция инкубационного времени и температуры. Прежде, чем начать испытание, рекомендуется, чтобы все реактивы были готовы, сняты колпачки, все необходимые лунки были в штативе, и т.д. Это гарантирует равно затраченное время для каждого шага без прерывания.

Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

Процедура Теста

Каждый пробег должен включать стандартную кривую.

Закрепите необходимое количество микротитровальных лунок в штативе.

Распределите 150 мкл Буфер Анализа во все лунки.

Распределите 50 мкл каждого Стандарта, Контроля и Образцов новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.

Инкубируйте в течение 90 минут при комнатной температуре на аппарате для встряхивания плашки с ~ 700 об./мин.

Быстро встряхните содержание лунок. Промойте лунки 4 раза с 300 мкл разбавленного Раствора для Промывки. Резко vystучите лунки на гигроскопичной бумаге, чтобы удалить остаточные капельки.

Важное примечание: Чувствительность и точность этого зависят от правильного исполнения процедуры промывки!

Распределите 100 мкл Ферментного Конъюгата во всех лунках.

Инкубируйте в течение 90 минут при комнатной температуре на аппарате для встряхивания плашки с ~ 700 об./мин.

Быстро встряхните содержание лунок. Промойте лунки 4 раза с 300 мкл разбавленного Раствора для Промывки. Резко vystучите лунки на гигроскопичной бумаге, чтобы удалить остаточные капельки.

Добавьте 100 мкл Раствора Субстрата каждой лунке.

Инкубируйте в течение 15 минут в комнатной температуре.

Остановите ферментативную реакцию, добавляя 100 мкл Стоп-раствора в каждую лунку.

Считайте оптическую плотность (ОП) каждой лунки при 450 ± 10 нм микропланшетным ридером.

Рекомендуется, чтобы лунки читались в течение 10 минут после добавления Стоп-раствора.

Вычисление Результатов

Вычислите средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.

Используя полулогарифмическую миллиметровку, создайте стандартную кривую, изображая среднюю абсорбцию, полученную из каждого стандарта против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрации на горизонтали (X) оси.

Используя среднее значение абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию от стандартной кривой.

Автоматизированный метод: результаты, показанные в данной инструкции, были вычислены автоматически с использованием 4 ПЛ (4-хПараметровой Логистики) кривой. 4-хПараметровая Логистика – метод выбора. Другие функции могут дать немного различные результаты.

Концентрация образцов может читаться непосредственно по этой стандартной кривой. Образцы с концентрациями выше, чем у самого высокого стандарта должны быть разбавлены и проанализированы заново либо представлены как > 128 пг/мл. Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

Пример Типичной Стандартной Кривой

Следующие данные предназначены только для демонстрации и не могут использоваться для реального теста.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Стандарт 0 (0 пг/мл)	0,09
Стандарт 1 (4 пг/мл)	0,19
Стандарт 2 (16 пг/мл)	0,44
Стандарт 3 (32 пг/мл)	0,78
Стандарт 4 (64 пг/мл)	1,14
Стандарт 5 (128 пг/мл)	2,48

Ожидаемые Нормальные ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определила свои собственные нормальные и патологические значения.

Следующие значения наблюдаются в плазме при исследовании, проводимом с очевидно нормальными здоровыми взрослыми, используя Ренин ИФА,:

Совокупность	n	Медиана (пг/мл)	Средняя (пг/мл)	5 – 95%-ый Диапазон (пг/мл)
Здоровые нормальные люди	75	14,37	15,55	3,30 – 31,71

Уровень активного ренина в плазме может быть вызван гипотензивным лечением (например, мочегонные средства, ингибиторы АХЭ, бета адренергические блокирующие агенты, или сосудорасширяющие средства).

Одни результаты сами по себе не должны быть единственной причиной для любых терапевтических последствий. Результаты должны коррелировать с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами.

Контроль качества

Стандарт GLP требует, чтобы контроль использовался при каждой калибровочной кривой.

Статистически значительное количество контролей должно быть измерено, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, гарантирующие точную работу.

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственному регулированию и нормам федерального права. Использованию контрольных образцов рекомендуется использовать повседневно для проверки подлинности результатов. Используйте контроли на нормальных и на патологических уровнях.

Контрольные значения и соответствующие результаты лаборатории ОТК заявлены в листе контроля качества (КК), вложенном в набор. Значения и диапазоны, обозначенные в листе КК, относятся всегда только к текущей партии (лоту) набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов. Также рекомендуется использовать национальные или международные программы Оценки Качества, чтобы гарантировать точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для того, чтобы проанализировать значения контроля и тренды. Если результаты анализа не вписываются в указанные диапазоны контроля, результаты пациента должны считаться неверными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические аспекты: раскапывание из пипетки и измерительные устройства; фотометр, сроки годности реактивов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывки.

После проверки вышеупомянутых параметров, не находя ошибки, пожалуйста, свяжитесь с Вашим дистрибьютором или IBL непосредственно.

Характеристики анализа

Динамический Диапазон Анализа

Диапазон испытания между 0,81 – 128 пг/мл.

Специфичность Антител (Перекрестная реактивность)

Следующие вещества были проверены на перекрестную реактивность теста:

Средняя перекрестная реакционная способность с Проренином составляла 0.69 % (среднее значение, когда проренин был усилен в диапазоне концентраций от 256 – 4096 пг/мл). Однако наблюдаемая перекрестная реакционная способность может только показать контаминацию рекомбинантного проренина активным ренином из-за автоактивации.

Перекрестная реактивность против человеческого сывороточного альбумина, человеческого гамма-глобулина, человеческого гепсидина и пепсина не была обнаружена.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность ИФА была вычислена, добавив 2 среднеквадратичных отклонения к средним из 20 репликатов обследования Нулевого Стандарта (S0), и составила 0,81 пг/мл.

Воспроизводимость

Интра-тест

Вариабельность внутри постановки показана ниже:

Образец	1	2	3
Средний (пг/мл)	19,3	24,1	81,4
КВ (%)	7,3	6,2	5,5
n =	20	20	20

Интер-тест

Межпостановочная вариабельность показана ниже:

Образец	1	2	3
Средний (пг/мл)	10,1	19,0	25,0
КВ (%)	7,3	4,2	7,6
n =	12	12	12

Восстановление

Образцы были усилены добавлением растворов Ренина с известными концентрациями в соотношение 1:1.

Восстановление (%) было вычислено умножением отношения измерений и ожидаемых значений на 100 (ожидаемое значение = (эндогенный Ренин + добавленный Ренин) / 2; из-за разбавления 1:2 плазмы с усиленным материалом).

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [пг/мл]	8,3	22,9	26,0
Среднее Восстановление	99,6	104,3	99,5
Диапазон Восстановления [%]	от 89,5	99,7	93,4
	до 108,2	109,1	108,8

Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [пг/мл]	28,74	34,6	91,3
Среднее Восстановление	96,5	97,2	87,9
Диапазон Восстановления [%]	от 90,7	93,2	85,3
	к 101,4	101,8	89,8

Ограничения Использования

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены только тогда, когда процедура анализа будет выполнена с полным пониманием инструкции, вложенной в набор, а также когда будет привязка к стандарту GLP.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого теста могут повлиять на результаты.

Мешающие Вещества

Гемоглобин (до 1 мг/мл), Билирубин (до 0.5 мг/мл) и Триглицерид (до 30 мг/мл) не имеет никакого влияния на результаты анализа. Перекрестная реактивность

Лекарственное взаимодействие

До сих пор нам не известны никакие вещества (препараты), которые имеют влияние на измерение Ренина в образце. Однако уровень активного ренина в плазме может быть вызван гипотензивным лечением (например, мочегонные средства, ингибиторы АХЭ, бета адренергические блокирующие агенты, или сосудорасширяющие средства)

Эффект Крюка при большой дозе

Никакой эффект крюка не наблюдался в этом тесте до 8192 пг/мл Ренина.

Юридические Аспекты

Надежность Результатов

Тест должен быть выполнен в строгом соответствии с инструкциями пользователя, предоставляемыми изготовителем. Кроме того, пользователь должен строго следовать правилам GLP (Хорошая Лабораторная Практика) или другим национальным стандартам и/или законам. Это особенно важно для использования контрольных реактивов. Важно всегда включать в процедуру теста достаточное число контролей для того, чтобы подтвердить правильность и точность теста.

Результаты испытаний действительны, только если все контроли в пределах указанных диапазонов и если все другие параметры теста также в пределах спецификаций анализа. В случае любого сомнения или беспокойства, пожалуйста, обратитесь в IBL.

Терапевтические Показания

Терапевтические последствия никогда не должны быть основаны на одних только лабораторных результатах, даже если все результаты испытаний согласуются с вещами, указанными под пунктом 11.1. Любой лабораторный результат - только часть полной клинической картины пациента.

Только в случаях, когда лабораторные результаты находятся в приемлемом соответствии с полной клинической картиной пациента, должны быть прописаны терапевтические показания.

Сам результат испытаний никогда не должен быть единственным определяющим фактором для того, чтобы получить любые терапевтические показания.

Ответственность

Любая модификация тест-набора, а также замена или смешивание любых компонентов различных партий (лотов) от одного набора к другому могут отрицательно сказаться на ожидаемых результатах и правильности теста. Такая модификация и/или замена лишают законной силы любое рекламационное требование.

Требования из-за неверного истолкования покупателем лабораторных результатов, подпадающие под пункт 11.2. также не принимаются. Независимо от рекламации, ответственность изготовителя не будет превышать цены набора. Любой ущерб, нанесенный набору во время транспортировки, не подпадает под ответственность изготовителя.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.

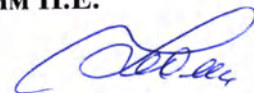
Всего прошито
и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения Chromogranin A

Иммуноферментный набор для количественного определения хромогранина в человеческой сыворотке.

Назначение

Данный набор предназначен для количественного определения хромогранина А в человеческой сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа. При анализе данным методом хук-эффект при высоких концентрациях не наблюдается до уровня хромогранина 1,000,000 нг/мл. Метод может быть использован с целью выявления феохромоцитом и нейроэндокринных опухолей.

Введение

Хромогранин А – это кислый белок с м.м. 49 кДа, который состоит из 439 аминокислотных остатков, ген локализован на 14 хромосоме. Хромогранин А выявляется во многих нормальных и неопластических эндокринных тканях. Показано, что повышенный уровень циркулирующего хромогранина А может быть маркером нейроэндокринных опухолей. Однако наиболее значимым в клинической практике является использование хромогранина А в диагностике феохромоцитом. Ниже приведено краткое описание возможностей использования хромогранина А.

1. Очень чувствительный (83%) и высоко специфический (96%) маркер диагностики и мониторинга феохромоцитомы. Препараты, обычно используемые в диагностике и лечении феохромоцитомы, оказывают очень незначительное влияние на уровень хромогранина А в плазме крови. Это является огромным преимуществом измерения хромогранина А вместо катехоламинов.
2. Установление происхождения опухоли. Высокий уровень хромогранина А указывает на опухоль нейроэндокринного происхождения.
3. Эндокринные опухоли, которые не продуцируют специфических гормонов, например, кальцитонин негативная, но хромогранин А секретирующая С-клеточная карцинома; нуль-клеточная карцинома; бета-клеточная карцинома; карцинома паращитовидной железы.

Принцип метода

Данный метод разработан и произведен для количественного определения человеческого хромогранина А в образцах сыворотки. Метод основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе, с использованием двух типов антител, направленных к различным эпитопам человеческого хромогранина А. Стандарты, контроли и образцы сывороток вносят в лунки микропланшета, покрытые поликлональными антителами к хромогранину А. Во время первой инкубации антитела, сорбированные в лунках микропланшета, захватывают человеческий хромогранин А, присутствующий в образцах. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят моноклональные антитела к хромогранину А, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), и в ходе инкубации образуется «сэндвич»: моноклональные антитела – человеческий хромогранин А – поликлональные антитела. Несвязавшиеся моноклональные антитела удаляются при промывке. Затем в лунки вносят раствор субстрата и инкубируют в течение определенного интервала

времени, а затем реакция останавливается и интенсивность развившегося окрашивания измеряется с помощью микропланшетного спектрофотометра. Энзиматическая активность иммунных комплексов, связанных в лунках микропланшета, содержащих хромогранин А, прямо пропорциональна количеству хромогранина А в образцах. Калибровочную кривую строят по значениям абсорбции, полученным для соответствующих стандартов хромогранина А, используя аппроксимации от точки к точке, кубический сплайн или четырехпараметрическую аппроксимацию. Концентрацию человеческого хромогранина А в образцах определяют непосредственно по калибровочной кривой.

Реагенты: подготовка и хранение

Набор должен храниться при 2 – 8°C после получения. Срок годности набора указан на этикетке набора. Все не вскрытые реагенты стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке набора.

Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Не заменяйте и не смешивайте реагенты из наборов разных лотов.

Обозначение, Количество	Компонент												
 12x8	Микропланшет. 1 микропланшет, 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов (96 лунок), покрытых антителами к человеческому хромогранину А (CgA). Поставляется в запечатанном пакете с осушителем. Должен храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.												
<table><tr><td>A</td><td>H</td><td>C</td></tr><tr><td>b</td><td>R</td><td>O</td></tr><tr><td></td><td>P</td><td>N</td></tr><tr><td></td><td></td><td>C</td></tr></table> 1 флакон, 0.6 мл	A	H	C	b	R	O		P	N			C	Детектирующие антитела Антитела к человеческому хромогранину А, конъюгированные с HRP, в стабилизированном белковом матриксе. Перед использованием данный реагент должен быть разведен буфером для разведения. Должен храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
A	H	C											
b	R	O											
	P	N											
		C											
<table><tr><td>D</td><td>B</td></tr><tr><td>I</td><td>U</td></tr><tr><td>L</td><td>F</td></tr></table> 1 флакон, 12 мл	D	B	I	U	L	F	Буфер для разведения Готов к использованию. Должен быть использован только для разведения детектирующих антител, согласно протоколу анализа. Должен храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.						
D	B												
I	U												
L	F												
<table><tr><td>I</td><td>B</td></tr><tr><td>N</td><td>U</td></tr><tr><td>C</td><td>F</td></tr></table> 1 флакон, 30 мл	I	B	N	U	C	F	Инкубационный буфер Готов к использованию. Раствор фосфатного буфера, содержащий БСА. Должен храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.						
I	B												
N	U												
C	F												
	Буфер для промывок Концентрат 30х. Перед использованием разведите концентрированный												

W A S H S O L N C O N C 1 флакон, 20 мл	буфер в 580 мл дистиллированной воды и тщательно перемешайте. После разведения полученный рабочий раствор буфера для промывок содержит сурфактант в фосфатном буфере и консервант, не содержащий азиды. Разведенный буфера для промывок должен храниться при комнатной температуре и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
C H R O M T M B 1 флакон, 12 мл	Субстратный раствор ТМВ Раствор тетраметилбензидина (ТМВ) с перекисью водорода. Должен храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
S T O P S O L N 1 флакон, 12 мл	Стоп-раствор 0.5 М серная кислота. Должен храниться при 2 – 8°C или при комнатной температуре и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора
C A L N 5 флаконов, лиофилизированные	Стандарты 0 - 4 Каждый содержит человеческий хромогранин А в бычьей сыворотке, с консервантом, не содержащем азиды. Точные концентрации указаны на этикетках каждого флакона. Должны храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
CO NT RO L N 2 флакона, лиофилизированные	Контроли 1 - 2 Каждый содержит человеческий хромогранин А в бычьей сыворотке, с консервантом, не содержащем азиды. Точные концентрации указаны на этикетках каждого флакона. Должны храниться при 2 – 8°C и стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке набора

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *in vitro*.

Бычья сыворотка, использованная для производства реагентов данного набора, была получена только от здоровых животных, находившихся под ветеринарным контролем, без выявленных контагиозных заболеваний.

При работе с образцами и реагентами используйте лабораторные перчатки, обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфекционно опасными материалами. Избегайте контакта с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода или серную кислоту. ТМВ может вызывать раздражение кожи и слизистых, вызывать кожную аллергическую реакцию.

Предполагается, что ТМВ обладает канцерогенными свойствами.

Серная кислота может вызвать серьезное раздражение при контакте с кожей. Не допускайте её попадания на кожу, в глаза или на одежду. Не глотайте, не вдыхайте, не вдыхайте испарения серной

кислоты. При контакте с серной кислотой немедленно промойте место попадания большим количеством воды в течение не менее 15 минут.

Соблюдайте правила «Хорошей лабораторной практики».

МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

1. Калиброванные одноканальные микропипетки для внесения объемов 10 мкл, 50 мкл, 100 мкл и 1000 мкл.
2. Многоканальная (восьмиканальная) пипетка на 100 мкл.
3. Соответствующие наконечники к микропипеткам.
4. Одноразовые пробирки 12 x 75 мм или стеклянные пробирки 13 x 100.
5. Одноразовые пластиковые флаконы объемом 100 мл и 1000 мл, с крышками.
6. Алюминиевая фольга.
7. Деионизированная или дистиллированная вода.
8. Пластиковая крышка для микропланшет или пленка для заклеивания стрипов.
9. Автоматической промывочное устройство (вошер) для микропланшет или сжимаемая бутыл.
10. Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450 нм.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа в дублях данным методом определения хромогранина А требуется только 50 мкл человеческой сыворотки. Не требуется специальной подготовки пациента перед сбором образца крови. Соберите цельную кровь и дайте ей свернуться при комнатной температуре, в течение не менее 30 минут, перед тем, как отделять сыворотку центрифугированием (850 – 1500x g в течение 10 минут). Сыворотку необходимо отделить от сгустка не позднее чем через 3 часа после сбора образца крови. После центрифугирования перенесите сыворотку в чистую пробирку. Образцы сывороток могут храниться при 2 - 8°C, если они будут протестированы в течение 72 часов после получения. В ином случае образцы необходимо хранить при -20°C или ниже, до тестирования. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания (более трех циклов) образцов.

Процедура метода

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- (1) Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Не заменяйте и не смешивайте реагенты из наборов разных лотов.
- (2) Буфер для промывок должен быть приготовлен перед началом анализа. См. раздел «Реагенты» .
- (3) Растворите все стандарты и контроли, для этого внесите по 0.5 мл дистиллированной воды в каждый флакон. Оставьте растворенные станарты и контроли на 10 минут, а затем тщательно перемешайте переворачиванием или на вортексе. Перед использованием убедитесь, что весь лиофизизат полностью растворился. Растворенные стандарты и контроли должны храниться при -20°C или ниже. Не допускайте более 3х циклов замораживания/оттаивания.

2. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- (1) Установите необходимое для текущей постановки количество стрипов в рамку-держатель, с учетом анализа всех стандартов, контролей и образцов, в дублях.
- (2) Схема микропланшета

Ряд	стрип 1	стрип 2	стрип 3
A	CAL 0	CAL 4	SAMPLE 2
B	CAL 0	CAL 4	SAMPLE 2
C	CAL 1	C 1	SAMPLE 3
D	CAL 1	C 1	SAMPLE 3
E	CAL 2	C 2	SAMPLE 4
F	CAL 2	C 2	SAMPLE 4
G	CAL 3	SAMPLE 1	
H	CAL 3	SAMPLE 1	

CAL – стандарт
SAMPLE - образец

- (3) Внесите по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки.
 - (4) Внесите по 100 мкл инкубационного буфера в каждую лунку
 - (5) Закройте микропланшет крышкой или пленкой и инкубируйте на орбитальном шейкере (170 rpm) при комнатной температуре 2 часа.
 - (6) Приготовьте детектирующие антитела, для этого разведите раствор антител, поставляемый в наборе, в 21 раз буфером для разведения. Для тестирования каждого стрипа необходимо развести в 1 мл инкубационного буфера 50 мкл антител, в чистой пробирке или флаконе.
- В таблице ниже приведены количества рабочего раствора антител, необходимые для анализа определенного количества стрипов.

Кол-во стрипов	Буфер для разведения	Детектирующие антитела
1	1 мл	50 мкл
2	2 мл	100 мкл
3	3 мл	150 мкл
4	4 мл	200 мкл
5	5 мл	250 мкл
6	6 мл	300 мкл
7	7 мл	350 мкл
8	8 мл	400 мкл
9	9 мл	450 мкл
10	10 мл	500 мкл
11	11 мл	550 мкл
12	12 мл	600 мкл

Замечание: рабочий раствор детектирующих антител необходимо готовить свежий для каждой постановки

- (7) Снимите крышку с микропланшета. Аспирируйте жидкость из каждой лунки. Промойте каждую лунку 5 раз, используя по 350 мкл буфера для промывок на каждую лунку при каждом цикле промывки. На каждом цикле промывки тщательно аспирируйте всю жидкость из лунок. Альтернативно, можно использовать вошер.
- (8) Внесите по 100 мкл рабочего раствора детектирующих антител в каждую лунку.
- (9) Закройте микропланшет крышкой или пленкой и инкубируйте на орбитальном шейкере (170 rpm) при комнатной температуре 1 час.
- (10) Снимите крышку с микропланшета. Аспирируйте жидкость из каждой лунки. Промойте каждую лунку 5 раз, используя по 350 мкл буфера для промывок на каждую лунку при каждом цикле промывки. На каждом цикле промывки тщательно аспирируйте всю жидкость из лунок. Альтернативно, можно использовать вошер.
- (11) Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ в каждую лунку.
- (12) Закройте микропланшет крышкой или пленкой и алюминиевой фольгой, так чтобы избежать попадания света.
- (13) Инкубируйте при комнатной температуре 20 минут.
- (14) Снимите алюминиевую фольгу и крышку (пленку). Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Аккуратно перемешайте.
- (15) Считайте абсорбцию (ОП) при длине волны 450 нм не позднее чем в течение 10 минут после добавления стоп-раствора, с помощью микропланшетного ридера

ЗАМЕЧАНИЕ: для снижения фонового окрашивания, можно использовать считывание при двух длинах волн 450 нм – основная длина волны, и референсная длина волны 595 нм или 620 нм или 630 нм.

ЗАМЕЧАНИЕ ПО ПРОЦЕДУРЕ

1. Все стандарты, контроли и образцы рекомендуется анализировать в дублях. Все анализа данных и расчета результатов используйте среднее значение ОП дублей.
2. Храните чувствительные к свету реагенты в оригинальных коричневых флаконах.
3. Неиспользованные покрытые стрипы в тщательно закрытом пакете из фольги с осушителем, в защищенном от влаги месте.
4. Для гарантии хорошей воспроизводимости результатов тестирования используйте калиброванные пипетки и правильную технику пипетирования.
5. Время или температуре инкубации, отличающиеся от указанных в данной инструкции, могут повлиять на результаты.
6. Избегайте образования пузырей воздуха в лунках микропланшета, это может снизить эффективность связывания и повысить CV% дублей.
7. Перед использованием тщательно перемешайте все реагенты. Не допускайте образования пены.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

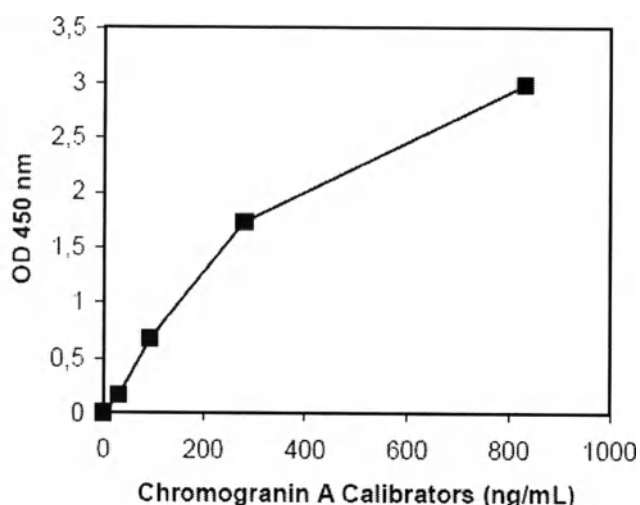
1. Рассчитайте среднее значение абсорбции дублей каждого стандарта.
2. Вычтите среднюю абсорбцию CAL 0 (0 нг/мл) из средних ОП всех остальных стандартов, контролей и образцов, для расчета скорректированной ОП.
3. Калибровочную кривую строят, откладывая скорректированные значения ОП стандартов по оси ординат, против соответствующих значений концентраций по оси абсцисс, используя построение от точки к точке или логарифмическую бумагу. Для расчета результатов может быть использовано соответствующее программное обеспечение.

ПРИМЕР ДАННЫХ И КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Ниже приведены типичные значения ОП и результаты анализа калибровочной кривой, получаемые при тестировании данным методом определения хромогранина А ELISA. Никогда не используйте данную калибровочную кривую для каких-либо расчетов. Калибровочная кривая должна быть проанализирована при каждой постановке.

Лунка	ОП, 450 нм			Результат, нг/мл
	Считанное	Среднее	Скорректированное	
0 нг/мл	0.078	0.076	0.000	
	0.074			
31 нг/мл	0.242	0.240	0.164	
	0.239			
93 нг/мл	0.757	0.748	0.672	
	0.740			
280 нг/мл	1.840	1.802	1.726	
	1.763			
830 нг/мл	3.139	3.059	2.983	
	2.980			
Контроль 1	0.444	0.447	0.371	56.27 нг/мл
	0.451			
Контроль 2	1.300	1.276	1.200	186.70 нг/мл
	1.252			

Human Chromogranin A ELISA



ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы от 72 здоровых взрослых доноров были протестированы данным методом определения хромогранина А ELISA. Нормальные значения лежали ниже 100 нг/мл. У 5 больных с феохромоцитомой уровень хромогранина А был выше 100 нг/мл, у одного из них он достиг 330000 нг/мл. Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить собственный диапазон нормальных значений.

Хотя с целью диагностики может быть использован уровень хромогранина А 100 нг/мл, рекомендуется определить базовый уровень хромогранина А для каждого пациента с целью послеоперационного мониторинга. Значительное повышение концентрации хромогранина А будет указывать на активность опухолевых клеток.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Так как не существует «Золотого Стандарта» определения хромогранина А, значения стандартов данного набора были установлены в соответствии с препаратом высоко очищенного хромогранина А.
2. Если концентрация аналита в образце выше уровня самого высокого стандарта, рекомендуется развести образец и протестировать еще раз.
3. Бактериальное или грибковое заражение образцов сывороток или реагентов, или перекрестное загрязнение реагентов или образцов могут привести к ошибочным результатам.
4. Вода, деионизированная с помощью полимеров, может привести к деактивации пероксидазы хрена.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для гарантии достоверности результатов в каждую постановку необходимо включать соответствующие контроли с известными уровнями хромогранина А. Дополнительно к поставляемым в наборе контролям рекомендуется включать во все постановки собственные лабораторные контроли хромогранина А.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Чувствительность

Чувствительность данного метода определения человеческого хромогранина А определена как 95% доверительный интервал для результатов тестирования 20 повторов нулевого стандарта, и составляет приблизительно 5 нг/мл.

Хук-эффект при высоких концентрациях

Показано, что при тестировании данным методом хук-эффект не наблюдается при концентрациях до 1,000,000 нг/мл. Это важно, так как у некоторых пациентов с феохромоцитомой концентрация хромогранина А может превышать 300,000 нг/мл.

Воспроизводимость

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием двух контролей в одной постановке, по 20 повторов каждого.

Среднее значение хромогранина А (нг/мл)	CV (%)
63.5	4.2
209.	3.6

Воспроизводимость между сериями определяли тестированием двух контролей, в дублях, по 12 постановок.

Среднее значение хромогранина А (нг/мл)	CV (%)
61.9	6.7
213.3	5.6

Линейность

Два образца человеческой сыворотки были разведены инкубационным буфером и протестированы. Результаты выражены в нг/мл:

#	разведение	Наблюдаемое значение	Ожидаемое значение	Извлечение, %
1	Нет	286	-	-
	1:2	138	143	96
	1:4	75	72	104
	1:8	37.9	36	105
	1:16	19.5	18	108
2	нет	61.8	-	-
	1:2	32.1	30.9	104
	1:4	15.9	15.5	103
	1:8	7.2	7.7	94

Извлечение

Два образца человеческой сыворотки были обогащены различными уровнями человеческого хромогранина А (1 объем + 1 объем смеси) и протестированы. Результаты выражены в нг/мл:

#	Исходное значение	Добавленное количество	Наблюдаемое значение	Ожидаемое значение	Извлечение, %
1	62.8	31	45.2	46.9	96
		93	75.6	77.9	97
		280	152.8	171.4	89
2	289	31	152.2	160	95
		93	176	191	92
		280	288.2	284.5	101

Краткая процедура метода:

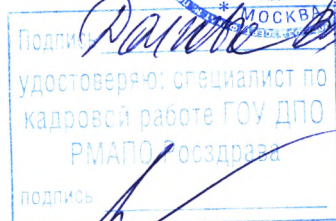
1. Внесите по 25 мкл стандартов, контроле и образцов соответствующие лунки.
2. Внесите по 100 мкл инкубационного буфера во все лунки.
3. Перемешайте, закройте микропланшет и инкубируйте при комнатной температуре на шейкере (170 грт) в течение 2 часов.
4. Промойте все лунки 5 раз.
5. Внесите по 100 мкл рабочего разведения детектирующих антител во все лунки.
6. Инкубируйте при комнатной температуре на шейкере (170 грт) в течение 1 часа.
7. Промойте все лунки 5 раз.
8. Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ во все лунки.
9. Закройте микропланшет и инкубируйте при комнатной температуре 20 минут.
10. Внесите 100 мкл стоп-раствора во все лунки.
11. Считайте ОП при 450 нм.

«СОГЛАСОВАНО»

**Зав. Кафедрой клинической
Лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»**



д.м.н., профессор Долгов В.В.
« ____ » _____ 2011г.



Всего прошито

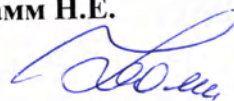
и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

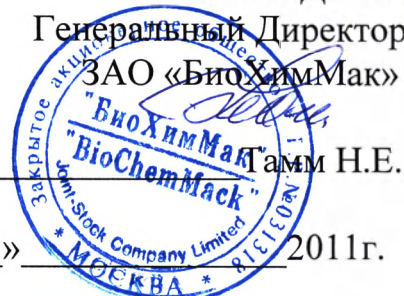
Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



Тамм Н.Е.

« _____ » _____ 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения PAPP-A ELISA

Иммуноферментный набор для количественного определения ассоциированного с беременностью плазменного белка А (PAPP-A) в целях диагностики in-vitro в человеческой сыворотке или плазме.

1.1 Назначение

Иммуноферментный набор для количественного определения ассоциированного с беременностью плазменного белка А (PAPP-A) в целях диагностики in-vitro в человеческой сыворотке или плазме.

1.2. Введение

PAPP-A – это делок, продуцируемый развивающейся плацентой. Его концентрация в материнской крови быстро повышается после 7й недели беременности. Измерение PAPP-A в первом триместре беременности является полезным маркером пренатального скрининга синдрома Дауна и других анеуплоидий плода. Сниженная концентрация PAPP-A в сочетании с возрастом женщины, уровнем свободной β -HCG и определением прозрачности шейной складки на УЗИ (NT) на 11 - 14 неделях беременности могут выявлять до 90 % беременностей с синдромом Дауна (7).

Данный метод IBL PAPP-A ELISA EIA-2397 может быть использован для оценки риска наличия синдрома Дауна (трисомия 21) в первом триместре беременности. Для оценки риска наличия синдрома Дауна и других анеуплоидий PAPP-A должен определяться в сочетании с другими анализами (например, определение свободной β -HCG и NT, см. выше) и необходимо использовать специальное программное обеспечение для выявления трисомии 21. Согласно Директиве IVD (98/79/EC) и программное обеспечение, и наборы для дополнительных исследований должны подходить для скрининга трисомии 21 и должны иметь соответствующий сертификат CE, с указанием идентификационного номера сертифицировавшей организации.

2. Принцип метода

Данный метод PAPP-A ELISA основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе. Лунки микропланшета покрыты поликлональными антителами к PAPP-A. Образцы сывороток пациентов, содержащие эндогенный PAPP-A, инкубируют в лунках микропланшета. После промывке в лунки вносят поликлональные антитела к PAPP-A, конъюгированные с HRP. После инкубации и промывки удаляют несвязавшиеся антитела-HRP. После внесения субстратного раствора развивающееся окрашивание пропорционально концентрации PAPP-A в образце.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор – только для диагностики in vitro. Только для профессионального использования.
2. Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были протестированы на HIV I/II, HBsAg и HCV методами, одобренными FDA, и во всех случаях были получены отрицательные результаты. Однако со всеми реагентами необходимо обращаться как с потенциально биоопасными веществами при работе и утилизации.
3. Перед началом анализа полностью и внимательно прочитайте инструкцию. Используйте только актуальную версию инструкции, поставляемую с набором. Убедитесь, что инструкция понятна полностью.

4. Микропланшет состоит из ломаемых стрипов. Неиспользованные стрипы должны храниться при 2 °С - 8 °С в тщательно запечатанном пакете с осушителем. Для установки стрипов используйте поставляемую в наборе рамку-держатель.
5. Пипетируйте реагенты и образцы как можно быстрее, и в одной и той же последовательности на всех этапах.
6. Используйте каждый резервуар только для одного реагента. Это особенно важно для работы с субстратом. Использование для пипетирования раствора субстрата резервуара, который был уже использован для пипетирования раствора конъюгата, может привести к окрашиванию раствора. Не возвращайте оставшиеся неиспользованные реагенты из резервуаров в оригинальные флаконы, это может привести к контаминации.
7. Аккуратно и тщательно перемешивайте содержимое лунок для получения хороших результатов. Не используйте лунки повторно.
8. Не давайте высыхать лункам во время постановки анализа; вносите реагенты сразу же после завершения промывки.
9. Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Температура влияет на считываемую ОП. Однако это не повлияет на получаемые результаты.
10. Не пипетируйте ртом и избегайте контактов реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Не курите, не ешьте, не пейте, не используйте косметику в помещении, где работаете с образцами или набором.
12. Используйте одноразовые лабораторные перчатки при работе с реагентами набора и образцами. Микробное заражение реагентов или образцов может привести к получению ложных результатов.
13. Работа должна соответствовать процедурам, определенным соответствующими национальными руководствами и требованиями по биобезопасности.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетках набора..
15. Используйте объемы, указанные в данной инструкции. Оптимальные результаты могут быть получены только при использовании калиброванных пипеток и микропланшетного ридера.
16. Не смешивайте или не используйте компоненты наборов разных лотов. Не заменяйте стрипы даже в наборах одного лота. Наборы могут доставляться или храниться при различных условиях, и характеристики связывания микропланшетов могут различаться.
17. Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим 0.5 M H₂SO₄, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Proclin 300, BND и/или MIT в качестве консервантов. При попадании в глаза или на кожу немедленно промойте большим количеством воды.
19. Субстрат ТМВ оказывает раздражающее воздействие на кожу и слизистые. При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды, при попадании на кожу тщательно промойте мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные вещи, прежде чем их брать и использовать. При вдыхании выйдите на открытый воздух.
20. Со всеми химическими реагентами, приготовленными и использованными необходимо обращаться как с опасными отходами, согласно национальным руководствам и требованиям по утилизации биоопасных отходов.
21. Информация об опасных веществах, входящих в состав набора, приведена в листе данных по безопасности материалов.
22. Данные по безопасности данного продукта доступны по запросу у производителя.

4. Реагенты:

4.1 Поставляемые реагенты

Количество	Компонент
1 x 12x8	Микропланшет. 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов, покрытых анти-РАРР-А антителами (поликлональными), в вакуумной упаковке с осушителем. Готовы к использованию.
6 x 0.15 мл	Стандарты (Стандарты 0-5), лиофилизированные; Концентрации: 0; 1; 2.5; 5.0; 15.0; 30.0 мкг/мл

	Преобразование: 1 мЕд/мл = 4.5 мг/л Стандарты метода IBL PAPP-A совместимы с референсными материалами для скрининга синдрома Дауна, одобренными NEQAS (Ед/л, IRP 76/610) См. Раздел «Подготовка реагентов»; Содержат 0.015% BND и 0.010% MIT в качестве консерванта.
2 x 0.15 мл	Контроли, высокий и низкий, лиофилизированные; Диапазон допустимых значений указан в сертификате контроля качества набора. См. Раздел «Подготовка реагентов»; Содержат 0.015% BND и 0.010% MIT в качестве консерванта.
1 x 25 мл	Рабочий буфер. Готов к использованию. Содержат 0.015% BND и 0.010% MIT в качестве консерванта..
1 x 1.5 мл	Ферментный конъюгат, концентрат 10х, конъюгат с пероксидазой хрена, Содержит 0.015% BND и 0.010% MIT в качестве консерванта..
1 x 14 мл	Буфер для разведения ферментного конъюгата, Готов к использованию, Содержит 0.03% Proclin, 0.015% BND и 0.010% MIT в качестве консерванта.
1 x 14 мл	Субстратный раствор Готов к использованию. Содержит раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ).
1 x 14 мл	Стоп-раствор. Содержит 0.5 М H ₂ SO ₄ . Готов к использованию. Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.
1 x 30 мл	Буфер для промывок, концентрат 40х. См. раздел «Подготовка реагентов».

Замечание: Дополнительно можно заказать нулевой стандарт для разведения образцов.

4.1.1 МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

Калиброванные пипетки

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450±10 нм

Бидистиллированная или деионизированная вода

Таймер (не менее 60 минут)

Бумажные салфетки, одноразовые наконечники

Полулогарифмическая графическая бумага или программное обеспечение для расчета результатов.

4.2 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

При хранении при 2-8°C не вскрытые реагенты стабильны до окончания срока годности. Не используйте реагенты после истечения срока годности.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микропланшет должен храниться при 2-8°C.

Тщательно закрывайте пакет со стрипами.

Вскрытый набор стабилен в течение 2х месяцев с момента вскрытия при хранении при указанных выше условиях.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры.

Стандарты

Растворите лиофилизированные стандарты в 150 мкл дистиллированной воды каждый.

Замечание: Растворенные стандарты стабильны в течение 2х месяцев при хранении при 2-8°C.

Контроли

Растворите лиофилизированные контроли в 150 мкл дистиллированной воды каждый, и оставьте не менее чем на 10 минут. Перед использованием тщательно перемешайте контроли.

Замечание: Растворенные контроли стабильны в течение 2х месяцев при хранении при 2-8°C.

Буфер для промывок

Разведите 30 мл концентрата буфера для промывок в 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Разведенный буфер для промывок стабилен 2 недели при комнатной температуре.

Ферментный конъюгат

Разведите 1.0 мл концентрата ферментного конъюгата в 10 мл буфера для разведения ферментного конъюгата за 30 минут до использования.

Замечание: Ферментный конъюгат должен быть приготовлен свежий для каждой постановки, за 30 минут перед его использованием, и он не может храниться дольше 24 часов. Если будет выполняться более одной постановки, разведите только количество, необходимое для текущей постановки.

4.4 Утилизация набора

Набор необходимо утилизировать в соответствии с национальными требованиями и руководствами. Специальная информация по данному продукту дана в листе безопасности материалов (см. раздел 13).

4.5 Повреждения набора

В случае какого-либо серьезного повреждения набора или компонентов набора, претензии должны предъявляться в письменном виде, не позднее чем через 1 неделю после получения набора. Серьезно поврежденный компонент не должен использоваться для выполнения анализа. Они должны храниться до принятия окончательного решения по рекламации. После решения компонент должен быть утилизирован в соответствии с официальными требованиями.

5 Образцы

Для тестирования данным методом должны быть использованы образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепариновой или цитратной).

Не используйте образцы с липемией, гемолизом, желтухой.

Замечание: не используйте образцы, содержащие азид натрия, для тестирования данным методом.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь обычной венопункцией, дайте ей свернуться, отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания. Для свертывания крови пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, может потребоваться большее время.

Плазма

Plasma:

Соберите цельную кровь в пробирки, содержащие антикоагулянт, и центрифугируйте немедленно после сбора.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны храниться в тщательно закрытых пробирках. Они могут храниться до 5 дней при 2-8°C.

Образцы ЭДТА плазмы могут храниться не дольше 48 часов при 2-8°C.

Для хранения в течение более длительного периода образцы должны быть заморожены, только один раз, при -20°C. Перемешайте переворачиванием оттаявшие образцы перед тестированием.

5.3 Разведение образцов

Если концентрация в образце превышает уровень самого высокого стандарта, образец должен быть разведен нулевым стандартом и протестирован еще раз.

При расчете концентрации в разведенном образце необходимо учитывать коэффициент разведения.

Пример:

а) разведение 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно перемешать)

б) разведение 1:100: 10 мкл разведения а) 1:10 + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно перемешать)

6 ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

6.1 ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

- Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Все реагенты необходимо перемешать перед использованием, без образования пены.
- Все стадии анализа должны проводиться без остановок.
- Используйте новые одноразовые наконечники для пипеток для пипетирования каждого стандарта, образца и контроля, с целью избежать перекрестного загрязнения.
- Абсорбция зависит от времени и температуры инкубации. Перед началом тестирования рекомендуется приготовить все реагенты, открыть крышки, установить необходимое количество лунок в рамку-держатель и т.д.. Это обеспечит одинаковое время на каждом этапе пипетирования.
- Обычно энзиматическая реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Все стандарты, образцы и контроли должны анализироваться в дублях, одновременно, так, чтобы условия анализа были одинаковые. Калибровочную кривую необходимо включать в каждую постановку.

1	Установите необходимое количество лунок в рамку-держатель.
2	Внесите по 10 мкл каждого стандарта, контроля, и образца сыворотки, используя новые одноразовые наконечники, в соответствующие лунки микропланшета.
3	Внесите по 100 мкл рабочего буфера в соответствующие лунки микропланшета. Аккуратно перемешайте в течение 10 секунд. Полное перемешивание на данном этапе очень важно.
4	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
5	Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Замечание: чувствительность и воспроизводимость метода в значительной степени зависят от правильного выполнения процедуры промывки!
6	Добавьте в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
7	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
8	Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата ТМВ
10	Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.
11	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-раствора.
12	Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 450 ± 10 нм в течение 10 минут после внесения стоп-раствора.

6.3. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение ОП дублей для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте график зависимости полученных оптических плотностей Стандартов (ось у) от концентрации соответствующих Стандартов (ось х).
3. Используя среднее значение ОП каждого образца, определите соответствующую концентрацию по калибровочной кривой.
4. Автоматический метод: рекомендуется использовать 4 параметрическую аппроксимацию; результаты на примере были рассчитаны с помощью аппроксимации 4 PL (4 параметрическая). Другие методы аппроксимации могут давать несколько отличающиеся результаты.

5. Концентрация в образцах может быть считана непосредственно по калибровочной кривой. Образцы, концентрация которых выше самого высокого стандарта, должны быть разведены и протестированы еще раз, или должны быть определены как > 30 мкг/мл. При расчете концентрации в разведенных образцах необходимо учитывать коэффициент разведения.

Типичная калибровочная кривая для данного метода:

(Пример. Не использовать для реальных расчетов!)

Стандарт	ОП (450 нм)
Нулевой Стандарт (0 мкг/мл)	0.18
Стандарт 1 (1 мкг/мл)	0.38
Стандарт 2 (2.5 мкг/мл)	0.56
Стандарт 3 (5 мкг/мл)	0.83
Стандарт 4 (15 мкг/мл)	1.44
Стандарт 5 (30 мкг/мл)	1.80

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений.

7.1 Беременные женщины, первый триместр

238 образцов, взятых у беременных женщин, первый триместр, были протестированы данным методом IBL PAPP-A ELISA.

Значения были валидированы в сравнении с распределением Гаусса.

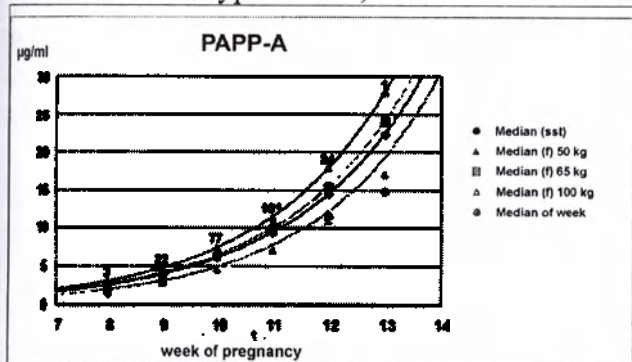
Учитывая вес тела и день гестации было получено следующее уравнение:

Медиана (f) PAPP-A = $\text{EXP} (-2.12268 + 0.06324 * \text{день гестации} - 0.00979 * \text{вес тела})$.

Если значения, полученные для тех же 238 беременных женщин, сравнивать только с учетом дня гестации (без учета веса тела), получается следующее уравнение, не зависящее от массы тела:

Медиана (sst) PAPP-A = $\text{EXP} (-2.705444 + 0.0618725 * \text{день гестации})$.

В приведенных ниже диаграмме и таблице были рассчитаны медианы функции (медиана (f)) для завершённой беременности на 8 - 13 неделях для трех масс тела (50 кг, 65 кг (средняя масса тела) и 100 кг). Для сравнения медианы были также определены вручную (медиана недели) и с использованием уравнения, не зависящего от массы тела (медиана (sst)).



Полных недель гестации	День гестации	Медиана (sst) [мкг/мл], не зависящая от массы тела	Медиана (f) [мкг/мл], вес 50 кг	Медиана (f) [мкг/мл], вес 65 кг	Медиана (f) [мкг/мл], вес 100 кг	Медиана недели, мкг/мл
8	59	2.57	3.06	2.6	1.88	1.5
9	66	3.97	4.77	4.1	2.92	3.0

10	73	6.12	7.42	6.4	4.55	6.7
11	80	9.43	11.55	10.0	7.08	10.5
12	87	14.55	17.99	15.5	11.03	11.6
13	94	22.43	28.00	24.2	17.17	14.9

Различия в исследуемых популяциях и условиях работы лабораторий могут привести к некоторому изменению медиан. Каждая лаборатория должна определить и постоянно обновлять свои собственные значения медиан, для собственной популяции. Регрессионные уравнения и значения, приведенные в таблице, должны быть использованы только как рекомендации. Расчет медиан и/или регрессий для расчета медиан для собственной базы данных пациентов должен быть выполнен с помощью программного обеспечения, предназначенного для расчета риска трисомии 21. Медианы, определенные для набора IBL PAPP-A ELISA не могут быть использованы при тестировании наборами других производителей. Медианы, определенные для наборов других производителей, не могут быть использованы при тестировании данным методом IBL PAPP-A ELISA.

7.1.1 Использование для скрининга синдрома Дауна

Для расчета риска в пренатальном скрининге синдрома дауна концентрация PAPP-A выражается как MOM (кратное медианы), $MOM = \text{измеренная концентрация (PAPP-A)} / \text{медиана PAPP-A}$. При беременности с синдромом Дауна медиана MOM для PAPP-A повышается на протяжении первого триместра и не отличается от нормальной беременности во втором триместре (6, см. таблицу). Таким образом PAPP-A необходимо определять в первом триместре беременности (полных недель 10–13).

Полных недель беременности	10	11	12	13	14-20
Медиана MOM при беременности с синдромом Дауна	0,34	0,42	0,50	0,58	1,11

Данные из публикации 6.

Для расчета риска трисомии 21 необходимо определять не только PAPP-A, но и другие параметры, такие как ВНСГ и определением прозрачности шейной складки на УЗИ (NT), в первом триместре, и/или AFP, свободный эстриол и НСГ во втором триместре. Использование этих параметров для расчета риска трисомии 21 требует специального программного обеспечения. Согласно Директиве IVD (98/79/EC) и программное обеспечение и наборы должны быть предназначены для скрининга трисомии 21 и иметь сертификат CE, выданные уполномоченной организацией, с указанием с указанием идентификационного номера сертифицировавшей организации на сертификате CE программного обеспечения и наборов. Программное обеспечение должно позволять расчет медиан по измерениям, выполненным в лаборатории.

Обязательно необходимо учитывать дополнительные факторы, такие как возраст женщины, вес, этническая группа, курение. Недооценка срока гестации может привести к ложно высокому рассчитанному риску (ложно положительный результат). Для снижения этого источника ошибки очень важно определить срок гестации как можно точнее. Расчет срока гестации по последнему менструальному циклу связан с высоким риском отклонений. Эхографическое определение копчиково-теменного размера (CRL) или расстояния между теменными буграми (BIP) рекомендуется для правильного определения срока гестации.

Измерение PAPP-A в пренатальном скрининге определяет только риск трисомии 21. Для подтверждения трисомии 21 требуются генетические исследования.

8. Контроль качества

Правила хорошей лабораторной практики требуют постановки контролей в каждой постановке. Должно быть протестировано статистически значимое количество контролей, для определения средних значений и допустимых диапазонов, для обеспечения необходимого качества постановки. Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с национальными требованиями. Использование контрольных образцов необходимо для ежедневного подтверждения достоверности результатов. Используйте контроли и с нормальными и с патологическими уровнями.

Контроли и соответствующие результаты лабораторного QC указаны в сертификате QC, поставляемом с набором. Значения и диапазоны, указанные в сертификате QC всегда относятся к определенному лоту и должны быть использованы для прямого сравнения результатов.

Рекомендуется участвовать в национальных или международных программах контроля качества для обеспечения точности результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных результатов и трендов. Если результаты тестирования не удовлетворяют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты, полученные для образцов сывороток пациентов, должны быть признаны недействительными.

В таком случае проверьте следующие технические характеристики: сроки годности реагентов (приготовленных), условия хранения, пипетки, оборудование, условия инкубации и методику промывки.

Если проверка перечисленных характеристик не выявила ошибки, обратитесь к поставщику.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

9.1 Диапазон определяемых значений

Диапазон определяемых значений метода 0.133 мкг/мл – 30 мкг/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Антитела, использованные в методе IBL PAPP-A ELISA, специфичны по отношению к человеческому PAPP-A. Не выявлено перекрестной реактивности с другими видами.

9.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была рассчитана из среднего значения ОП 20 повторов нулевого стандарта, плюс 2 стандартных отклонения, и составила 0.133 мкг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии приведена ниже:

образец	n	Среднее (мкг/мл)	CV (%)
1	20	1.12	2.89
2	20	10.17	2.81

9.4.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями приведена ниже:

образец	n	среднее (мкг/мл)	CV (%)
1	12	1.18	7.18
2	12	10.94	5.72

9.5 Извлечение

образец	Добавленный мкг/мл	Измеренный мкг/мл	Ожидаемый мкг/мл	извлечение
1	--	19.89	19.89	100
	1.25	10.94	11.20	97.7
	2.50	12.00	12.45	96.4
	7.50	17.66	17.45	101.2

	15.00	24.78	24.95	99.3
	--	2.17	2.17	100
	1.25	2.44	2.34	104.3
2	2.50	3.44	3.59	96.0
	7.50	9.00	8.59	104.8
	15.00	15.77	16.09	98.1

9.6 Линейность

образец	разведение	Средняя концентрация, мкг/мл	извлечение (%)
	нет	20.90	100
	1:2	10.30	98.5
1	1:4	5.39	103.1
	1:8	2.61	100.0
	1:16	1.25	95.8
	нет	11.83	--
	1:2	5.80	98.1
2	1:4	2.82	95.3
	1:8	1.45	98.1
	1:16	0.73	98.8

10 ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

10.1 Интерференция

Любое неправильное обращение с образцами или изменение данного протокола может повлиять на результаты тестирования.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не оказывают влияния на результаты тестирования.

10.2 Влияние лекарственных веществ

До настоящего времени не выявлено веществ (лекарственных препаратов), которые бы влияли на результаты тестирования данным методом PAPP-A.

10.3 Хук-Эффект при высоких концентрациях

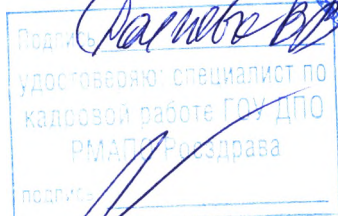
Не наблюдается Хук-эффекта при тестировании данным методом до концентрации 300 мкг/мл.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



Д.М.Н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

9 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения PLGF.

1. Введение

Данный набор предназначен для количественного определения человеческого плацентарного фактора роста (PLGF) в человеческой сыворотке.

Метод предназначен только для диагностики *in vitro*.

Ангиогенез и сосудистая трансформация являются важными процессами при нормальном развитии плаценты. Патологический ангиогенез и сосудистая трансформация считаются одной из основных причин преэклампсии у беременных и задержки внутриутробного развития. Плацентарный фактор роста (PLGF) принадлежит семейству VEGF, продуцируется в основном плацентой и является сильным ангиогенным фактором. Предполагается, что соответствующий рецептор, растворимая fms-подобная тирозин киназа-1, обладает ангиогенными свойствами.

2. Принцип метода

Данный метод PLGF ELISA основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе и предназначен для количественного определения PLGF в образцах сыворотки. Лунки микропланшета покрыты антителами к уникальному антигенному сайту молекулы PLGF. Образцы сывороток пациентов, содержащие эндогенный PLGF, инкубируют в лунках микропланшета.

После промывке в лунки вносят поликлональные антитела к PLGF, конъюгированные с биотином.

После инкубации и промывки удаляют несвязавшиеся антитела, и в лунки вносят конъюгат стрептавидин-HRP. После инкубации и промывки удаляют несвязавшийся стрептавидин- HRP.

Количество связавшейся пероксидазы пропорционально концентрации PLGF в образце.

После внесения субстратного раствора развивающееся окрашивание пропорционально концентрации PLGF в образце.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор – только для диагностики *in vitro*
- Информация об опасных веществах, входящих в состав набора, приведена в листе данных по безопасности материалов.
- Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были протестированы на HIV I/II, HBsAg и HCV методами, одобренными FDA, и во всех случаях были получены отрицательные результаты. Однако со всеми реагентами необходимо обращаться как с потенциально биоопасными веществами при работе и утилизации.
- Избегайте контакта со стоп-раствором, содержащим 0.5 M H₂SO₄, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контактов реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
- Не курите, не ешьте, не пейте, не используйте косметику в помещении, где работаете с образцами или набором.
- Используйте одноразовые лабораторные перчатки при работе с реагентами набора и образцами. Микробное заражение реагентов или образцов может привести к получению ложных результатов.
- Работа должна соответствовать процедурам, определенным соответствующими национальными руководствами и требованиями по биобезопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетках набора.

- Используйте объемы, указанные в данной инструкции. Оптимальные результаты могут быть получены только при использовании калиброванных пипеток и микропланшетного ридера.
 - Не смешивайте или не используйте компоненты наборов разных лотов. Не заменяйте стрипы даже в наборах одного лота. Наборы могут доставляться или храниться при различных условиях, и характеристики связывания микропланшетов могут различаться.
 - Со всеми химическими реагентами, приготовленными и использованными необходимо обращаться как с опасными отходами, согласно национальным руководствам и требованиям по утилизации биоопасных отходов.
 - Данные по безопасности данного продукта доступны по запросу у производителя.
- Листы данных по безопасности материалов соответствуют требованиям: руководство EU 91/155 ЕС.

4. Реагенты:

4.1 Поставляемые реагенты

Количество	Компонент
1 x 12x8	Микропланшет. 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов, покрытых анти-PLGF антителами (моноклональными), в вакуумной упаковке с осушителем. Готовы к использованию.
1 x 1 мл	Нулевой стандарт, Готов к использованию. Содержит < 0.3% Proclin в качестве консерванта.
5 x 1 мл	Стандарты (Стандарты 1-5), Готовы к использованию. Содержат : 25; 50; 125; 500; 1000 пг/мл, < 0.3% Proclin в качестве консерванта.
2 x 1 мл	Контроль Готов к использованию. Диапазон допустимых значений указан в сертификате контроля качества набора. Содержит < 0.3% Proclin в качестве консерванта.
1 x 30 мл	Рабочий буфер. Готов к использованию. Содержит < 0.3% Proclin в качестве консерванта.
1 x 14 мл	Ферментный конъюгат, Готов к использованию, биотинилированные козы анти тела к человеческому PLGF. Содержит < 0.3% Proclin в качестве консерванта.
1 x 14 мл	Ферментный комплекс, Готов к использованию, содержит конъюгат стретавидин-пероксидаза, 0.01% метилизотиазолин, 0.02% бромнитродидоксан в качестве консервантов.
1 x 14 мл	Субстратный раствор Готов к использованию. Содержит раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ).
1 x 14 мл	Стоп-раствор. Содержит 0.5 М H ₂ SO ₄ . Готов к использованию. Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.
1 x 30 мл	Буфер для промывок, концентрат 40х. См. раздел «Подготовка реагентов».

Замечание: Дополнительно можно заказать нулевой стандарт для разведения образцов.

4.1.1 МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

Калиброванные пипетки

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450±10 нм

Бидистиллированная или деионизированная вода

Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер

4.2 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

При хранении при 2-8°C невскрытые реагенты стабильны до окончания срока годности. Не используйте реагенты после истечения срока годности.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микропланшет должен храниться при 2-8°C. Тщательно закрывайте пакет со стрипами.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры.

Буфер для промывок

Разведите 30 мл концентрата буфера для промывок в 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Разведенный буфер для промывок стабилен 2 недели при комнатной температуре.

4.4 Утилизация набора

Набор необходимо утилизировать в соответствии с национальными требованиями и руководствами. Специальная информация по данному продукту дана в листе безопасности материалов (см. раздел 13).

4.5 Повреждения набора

В случае какого-либо серьезного повреждения набора или компонентов набора, претензии должны предъявляться в письменном виде, не позднее чем через 1 неделю после получения набора. Серьезно поврежденный компонент не должен использоваться для выполнения анализа. Они должны храниться до принятия окончательного решения по рекламации. После решения компонент должен быть утилизирован в соответствии с официальными требованиями.

5 Образцы

Для тестирования данным методом должны быть использованы образцы сыворотки.

Не используйте образцы с липемией, гемолизом, желтухой.

Замечание: не используйте образцы, содержащие азид натрия, для тестирования данным методом.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь обычной венопункцией, дайте ей свернуться, отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания. Для свертывания крови пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, может потребоваться большее время.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны храниться в тщательно закрытых пробирках. Они могут храниться до 24 часов при 2-8°C. Для хранения в течение более длительного периода образцы должны быть заморожены, только один раз, при -20°C. Перемешайте переворачиванием оттаявшие образцы перед тестированием.

5.3 Разведение образцов

Если концентрация в образце превышает уровень самого высокого стандарта, образец должен быть разведен рабочим буфером и протестирован еще раз.

При расчете концентрации в разведенном образце необходимо учитывать коэффициент разведения.

Пример:

а) разведение 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл рабочего буфера (тщательно перемешать)

б) разведение 1:100: 10 мкл разведения а) 1:10 + 90 мкл рабочего буфера (тщательно перемешать)

6 ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

6.1 ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

– Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Все реагенты необходимо перемешать перед использованием, без образования пены.

– Все стадии анализа должны проводиться без остановок.

– Используйте новые одноразовые наконечники для пипеток для пипетирования каждого стандарта, образца и контроля, с целью избежать перекрестного загрязнения.

- Абсорбция зависит от времени и температуры инкубации. Перед началом тестирования рекомендуется приготовить все реагенты, открыть крышки, установить необходимое количество лунок в рамку-держатель и т.д.. Это обеспечит одинаковое время на каждом этапе пипетирования.
- Обычно энзиматическая реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Все стандарты, образцы и контроли должны анализироваться в дублях, одновременно, так, чтобы условия анализа были одинаковые. Калибровочную кривую необходимо включать в каждую постановку.

1	Установите необходимое количество лунок в рамку-держатель.
2	Внесите по 25 мкл каждого стандарта, контроля, и образца сыворотки, используя новые одноразовые наконечники, в соответствующие лунки микропланшета.
3	Внесите по 250 мкл рабочего буфера в соответствующие лунки микропланшета.
4	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре, не закрывая микропланшет.
5	Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Замечание: чувствительность и воспроизводимость метода в значительной степени зависят от правильного выполнения процедуры промывки!
6	Добавьте в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
7	Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре, не закрывая микропланшет.
8	Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Внесите в каждую лунку по 100 мкл ферментного комплекса
10	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
11	Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 3 раза по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
12	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата ТМВ
13	Инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре.
14	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора.
15	Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 450 ± 10 нм в течение 10 минут после внесения стоп-раствора.

6.3. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение ОП дублей для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте график зависимости полученных оптических плотностей Стандартов (ось y) от концентрации соответствующих Стандартов (ось x).
3. Используя среднее значение ОП каждого образца, определите соответствующую концентрацию по калибровочной кривой.
4. Автоматический метод: результаты на примере были рассчитаны с помощью аппроксимации 4 PL (4 параметрическая). Другие методы аппроксимации могут давать несколько отличающиеся результаты.
5. Концентрация в образцах может быть считана непосредственно по калибровочной кривой. Образцы, концентрация которых выше самого высокого стандарта, должны быть разведены и протестированы еще раз. При расчете концентрации в разведенных образцах необходимо учитывать коэффициент разведения.

Типичная калибровочная кривая для данного метода:
(Пример. Не использовать для реальных расчетов!)

Стандарт	ОП (450 нм)
Нулевой Стандарт (0 пг/мл)	0.06
Стандарт 1 (25 пг/мл)	0.18
Стандарт 2 (50 пг/мл)	0.28
Стандарт 3 (125 пг/мл)	0.59
Стандарт 4 (500 пг/мл)	1.63
Стандарт 5 (1000 пг/мл)	2.35

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений.

Были протестированы образцы сывороток, взятые у практически здоровых людей. Ниже приведены полученные значения:

Популяция	Кол-во	PLGF (пг/мл)
Взрослые небеременные женщины	65	20.3 – 85.9
Мужчины	99	16.7 – 63.1

Концентрация PLGF при нормальной беременности постоянно повышается, достигая пика с 28 по 32 недели, а затем постоянно снижается (5% - 95% процентиль).

При беременности с гестозом медиана и нормальные значения значительно снижены:

Популяция	Кол-во	медиана PLGF (пг/мл)	5% – 95% процентиль PLGF (пг/мл)
Здоровые беременные женщины	59	207	33 - 918
Здоровые беременные женщины (27 – 32 неделя беременности)	17	537.95	161 – 950
Беременные женщины с гестозом	34	33.08	12 - 139
Беременные женщины с гестозом (27 – 32 неделя беременности)	13	77.14	13.97 - 268

Для оценки вероятности преэклампсии рекомендуется определять PLGF на 20-22 неделе беременности.

Если концентрация PLGF в сыворотке на 20-22 неделе беременности <100 пг/мл, существует повышенная вероятность развития преэклампсии при этой беременности.

Определение PLGF на более ранних сроках беременности также в результате может показать повышенный риск развития преэклампсии (15-16 неделя беременности < 50 пг/мл), однако, такие исследования еще не закончены.

8. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

8.1 Диапазон определяемых значений

Диапазон определяемых значений метода 0 – 1000 пг/мл.

8.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Показана перекрестная реактивность менее 20% с rhVEGF/PLGF и менее 0.07% с rhFLT, rmPLGF-2, rhPDGF и rhVEGF.

8.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была рассчитана из среднего значения ОП 20 повторов нулевого стандарта, плюс 2 стандартных отклонения, и составила < 1.062 пг/мл.

8.4 Воспроизводимость

8.4.1 Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии приведена ниже:

Образец	1	2
среднее (пг/мл)	50.45	478.64
SD (пг/мл)	1.43	8.06
CV (%)	2.83	1.68
n =	10	10

8.4.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями приведена ниже:

Образец	1	2
среднее (пг/мл)	45.8	421.4
SD (пг/мл)	1.88	29.48
CV (%)	4.10	7.00
n =	6	10

8.5 Точность

8.5.1 Контроль качества

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с национальными требованиями. Использование контрольных образцов необходимо для ежедневного подтверждения достоверности результатов. Используйте контроли и с нормальными и с патологическими уровнями.

Контроли и соответствующие результаты лабораторного QC указаны в сертификате QC, поставляемом с набором. Значения и диапазоны, указанные в сертификате QC всегда относятся к определенному лоту и должны быть использованы для прямого сравнения результатов.

Рекомендуется участвовать в национальных или международных программах контроля качества для обеспечения точности результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных результатов и трендов. Если результаты тестирования не удовлетворяют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты, полученные для образцов сывороток пациентов, должны быть признаны недействительными.

В таком случае проверьте следующие технические характеристики: сроки годности реагентов (приготовленных), условия хранения, пипетки, оборудование, условия инкубации и методику промывки.

Если проверка перечисленных характеристик не выявила ошибки, обратитесь к поставщику.

8.5.2 Извлечение

Образцы сыворотки были обогащены растворами PLGF с известными концентрациями, в соотношении 1:1.

% извлечения был рассчитан умножением отношения измеренной и ожидаемой концентраций на 100.

образец	Эндогенный PLGF, пг/мл	Добавленный PLGF, пг/мл	Измеренный PLGF, пг/мл	Ожидаемый PLGF	извлечение
1	21.28	0	21.28		
		500	509.59	510.64	99.8
		250	226.72	260.64	87.0
		63	63.98	73.14	87.5
		25	32.17	35.64	90.3
2	41.97	0	41.97		
		500	516.37	520.99	99.1
		250	283.89	270.99	104.8
		63	78.01	83.49	93.4
		25	40.63	45.99	88.4
3	444.18	0	444.18		
		500	682.31	722.09	94.5
		250	458.57	472.09	97.1
		63	279.63	284.59	98.3
		25	260.68	247.09	105.5

8.5.3 Линейность

Образцы сыворотки были разведены нулевым стандартом.

образец	разведение	Измеренный PLGF, пг/мл	Ожидаемый PLGF	извлечение
P2	нет	28.47	28.47	
	1 : 2	15.35	14.24	107.8
	1 : 4	7.82	7.12	109.9
	1 : 8	3.90	3.56	109.7
	1:16	2.00	1.78	112.6
P4	нет	49.73	49.73	
	1 : 2	21.89	24.86	88.1
	1 : 4	13.32	12.43	107.2
	1 : 8	6.95	6.22	111.9
	1:16	3.47	3.11	111.6
P5	нет	479.10	479.10	
	1 : 2	259.93	239.55	108.5
	1 : 4	122.22	119.77	102.0
	1 : 8	64.49	59.89	107.7
	1:16	32.89	29.94	109.8

9 ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

9.1 Интерференция

Любое неправильное обращение с образцами или изменение данного протокола может повлиять на результаты тестирования.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.5 мг/мл) не оказывают влияния на результаты тестирования.

Триглицериды с концентрацией до 1.9 мг/мл и выше могут влиять на результаты тестирования.

9.2 Влияние лекарственных веществ

До настоящего времени не выявлено веществ (лекарственных препаратов), которые бы влияли на результаты тестирования данным методом PLFG.

9.3 Хук-Эффект при высоких концентрациях

Не наблюдается Хук-эффекта при тестировании данным методом до концентрации 250000 пг/мл (250 нг/мл).

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » _____ 2011г.

Всего прошито

и пронумеровано

8 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения HMGB1

Иммуноферментный набор для количественного определения HMGB1 в человеческой сыворотке или плазме. Набор может быть использован для исследований образцов бычьей, свиной, кроличьей, мышинной и крысиной сыворотки, плазмы и СМЖ, культуральной среды и BALF.

1. Назначение

Данный набор предназначен для количественного определения HMGB1 в человеческой сыворотке или плазме. Набор может быть использован для исследований образцов бычьей, свиной, кроличьей, мышинной и крысиной сыворотки, плазмы и СМЖ, культуральной среды и BALF.

2. Введение

HMGB1 (белок 1 высокомобильной группы или амфотерин) – это белок с м.м. приблизительно 30 кДа, являющийся основным компонентом группы негистонового ядерного белка. HMGB1 является регулятором транскрипции и в норме содержится в ядре или цитоплазме клеток млекопитающих. HMGB1 играет важную роль в патогенезе злокачественных заболеваний. При развитии опухоли доставка кислорода к клеткам может нарушаться. Это приводит к гибели клеток (некрозу) и высвобождению HMGB1, что, в свою очередь, ведет к формированию новых кровеносных сосудов в опухолевом окружении, по направлению к опухоли. Эти сосуды обеспечивают выживание и дальнейший рост опухоли. Исследования *in vitro* показали, что количественное определение уровня HMGB1 может быть использовано для дифференцирования между патологической гибелью клеток (некрозом) и физиологической гибелью клеток (апоптозом). При некрозе наблюдаются значительно более высокие концентрации HMGB1.

Кроме того, HMGB1 также играет важную роль на поздней фазе септического шока. В экспериментах на животных показано, что ингибирование HMGB1 даже на поздней фазе септического шока значительно увеличивает выживаемость у крыс. HMGB1 действует путем связывания с RAGE («рецептор конечных продуктов гликозилирования») и оказывает провоспалительное действие, подобное эффекту таких цитокинов, как TNF- α и IL-6. Повышенный уровень HMGB1 может выявляться в сыворотке больных с сепсисом. Концентрация HMGB1 в кровотоке повышается при многих других заболеваниях, например, при ревматоидном артрите, (RA)

Остром повреждении легких (ALI) и синдроме диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC).

Данный метод HMGB1 ELISA разработан профессором Dr. Ikuro Maruyama и компанией Shino-Test Corporation (Japan). Набор производится компанией IBL по лицензии Shino-Test Corporation.

3. Принцип метода

Данный метод HMGB1 ELISA основан на «сэндвич»-иммуноферментном анализе и предназначен для количественного определения HMGB1 в образцах сыворотки и плазмы. Лунки микропланшета покрыты очищенными анти-HMGB1 антителами. Во время инкубации HMGB1 специфически связывается с анти-HMGB1 антителами, иммобилизованными в лунках, а затем распознается

вторыми антителами, конъюгированными с ферментом. После добавления субстратного раствора развивается цветная реакция, интенсивность которой пропорциональна количеству связавшегося HMGB1.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор – только для диагностики *in vitro*. Для использования специалистами.

Перед постановкой анализа внимательно прочитайте всю инструкцию. Используйте действующую версию инструкции, поставляемую с набором. Убедитесь в полном понимании всех этапов метода.

За более подробной информацией (клиническая значимость, характеристики метода, протоколы для автоматизированной процедуры, альтернативные применения, литература и т.д.) обращайтесь на сайт производителя или к эксклюзивному представителю IBL, компании БиоХимМак.

В случае повреждения упаковки набора, не используйте набор для анализа и свяжитесь с вашим поставщиком, не позднее чем в течение одной недели после получения заказа. Заявки по поводу повреждения упаковки должны быть направлены в письменном виде. Не используйте поврежденные компоненты, но храните их соответствующим образом до завершения обработки претензии.

Проверяйте номер лота и срок годности набора. Не смешивайте реагенты из разных лотов. Не используйте наборы с истекшим сроком годности.

Соблюдайте меры безопасности, принятые в вашей лаборатории. Работайте с реагентами и образцами в лабораторной одежде, одноразовых латексных перчатках и по необходимости в защитных очках, если необходимо.

Реагенты данного набора содержат опасные вещества, которые могут вызвать раздражение глаз, кожи и слизистой. Избегайте прямого контакта. Более подробная информация о составе реагентов приводится в разделе «Поставляемые реагенты» и на этикетках. Сведения о безопасности материалов приводятся на сайте производителя.

Химические вещества и приготовленные или использованные реагенты этого набора необходимо утилизировать как опасные отходы, в соответствии с принятыми нормами химической и биологической безопасности.

Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Набор при транспортировке не требует соблюдения особого температурного режима.

Полученный набор должен храниться при температуре 2-8°C. Не допускайте попадания прямых солнечных лучей и нагревания. Условия хранения образцов и приготовленных реагентов описаны в соответствующих параграфах инструкции. Стрипы после вскрытия упаковки могут храниться до указанного срока годности, если пакет со стрипами плотно закрыт и хранится при 2-8°C.

6. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Человеческая сыворотка

Кровь из вены берут обычным способом. Отбирайте сыворотку /плазму сразу же после центрифугирования (15 минут при не менее 1.000 g). Уровень HMGB1 может повышаться из-за цитолиза, если образцы были недостаточно центрифугированы или сыворотка/плазма находится в контакте с клетками крови значительный период времени.

Условия хранения:	2-8°C	-30°C (аликвоты)	-80°C (аликвоты)
Срок хранения	24 часа	6 месяцев	12 месяцев
Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания. Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания.			

HMGB1 может быть измерен в образцах супернатантов клеточных культур, СМЖ (CSF) и бронхоальвеолярной жидкости (BALF). При тестировании образцов супернатантов клеточных

культур, содержащих телячью сыворотку, присутствующий в среде бычий HMGB1 также определяется. Следовательно, необходимо включать в постановку отрицательный контроль.

7. Поставляемые реагенты:

Количество	Компонент
1 x 12x8 MTP	Микропланшет. 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов, покрытых анти-HMGB1 антителами (поликлональными), в вакуумной упаковке с осушителем. Готовы к использованию.
1 x ENZCONJ LYO	Ферментный конъюгат, лиофилизированный, содержит HMGB1,2, конъюгированный с пероксидазой. Указания по разведению приведены в разделе 10.1.
1 x CAL LYO	Стандарт, лиофилизированный, содержит HMGB1 (свиньи). Указания по разведению приведены в разделе 10.1.
1 x CONTROL+ LYO	Положительный контроль лиофилизированный, содержит HMGB1 (свиньи). Указания по разведению приведены в разделе 10.1.
1 x 20 мл DILBUF	Буфер для разведения. Готов к использованию. Содержит буфер, 0.01 % NaN3.
1 x 12 мл ENZCONJDIL	Буфер для разведения конъюгата Готов к использованию. Содержит буфер.
2 x 100 мл WASHBUF CONC	Буфер для промывок, концентрат 5x. Фосфатный буфер, <0.5 % Tween 20.
1 x 6 мл COLREA A	Цветной реагент А Готов к использованию. Содержит раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB).
1 x 6 мл COLREA B	Цветной реагент В Готов к использованию. Содержит забуференный 0.005 М раствор перекиси водорода.
1 x 12 мл COLOUR STOP	Стоп-раствор. Содержит 0.35 М H2SO4. Готов к использованию.
2 шт FOIL	Адгезивная пленка Для заклеивания стрипов во время инкубаций

8. МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- Микropипетки для внесения объемов 10; 20; 100; 100 – 1000 мкл, обеспечивающие дозирование с погрешностью менее 3% (CV < 3%),
- Вортекс
- Орбитальный шейкер (500 rpm)
- 8-канальный микродозатор и резервуары для реагентов к нему.
- Автоматическое или полуавтоматическое промывающее устройство, емкость для буфера для промывок
- Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450 нм (длина волны сравнения 600-650 нм)
- Бидистиллированная или деионизированная вода

- Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер
- Полистироловые (PS) или полипропиленовые (PP) пробирки для разведения образца
- Инкубатор на 37°C и 25°C

9. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

- Анализ данным методом может быть выполнен с использованием двух различных диапазонов измеряемых значений. Необходимо иметь дополнительно две аликвоты образца, на случай если концентрация в образце выше использованного диапазона измеряемых значений.
- Неправильное использование образцов или модификация процедуры анализа может отразиться на результате анализа. Вносимые объемы, время инкубации, температурный режим, последовательность стадий должны точно соответствовать, указанным в инструкции. Используемые микропипетки и другие инструменты должны быть точно откалиброваны.
- Все стадии анализа должны проводиться без остановок. Убедитесь, что все материалы, реагенты и инструменты готовы для постановки. Выньте реагенты из холодильника и дайте им нагреться до комнатной температуры (18-25 °C), каждый флакон с реагентом необходимо аккуратно встряхнуть перед использованием. Перемешивайте реагенты, избегая образования пены.
- Избегайте контаминации реагентов, микропипеток и пробирок. Используйте только новые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта или образца. Не меняйте крышки на флаконах. Не используемые флаконы должны быть закрыты. Нельзя повторно использовать стрипы, пробирки, реагенты.
- Все образцы необходимо тестировать в дублях, для выявления возможных ошибок пипетирования.
- Во избежание ошибок сверяйтесь со схемой планшета, где вы указано расположение лунок с определенными образцами.
- Время инкубации влияет на результат. Внесение образцов в лунки и промывку лунок необходимо проводить в одной той же последовательности и с одинаковыми периодами. Для внесения растворов в лунки рекомендуется использовать 8-канальный дозатор.
- Процедура промывки лунок очень важна для качества постановки анализа. Неправильная промывка дает ошибочные результаты. Рекомендуется использовать для промывки многоканальный дозатор либо автоматический вошер. Нельзя высушивать лунки между стадиями инкубации. Не поцарапайте поверхности лунок при заливке и аспирации промывочного буфера. Аккуратно вносите все реагенты. При заливке промывочного буфера проверяйте, чтобы лунка точно заполнялась буфером. Не допускайте остатка промывочного буфера после стадии промывки.
- Влажность влияет на покрытые лунки. Не открывайте пакет со стрипами, пока он не достигнет комнатной температуры. Неиспользуемые стрипы немедленно верните в пакет с осушителем и тщательно закройте пакет.
- Образование кристаллов в лунках не влияет на результаты анализа. Перед началом тестирования лунки промывать не надо!
- Калибровочную кривую необходимо анализировать при каждой постановке.

10. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

10.1. Подготовка лиофилизированных и концентрированных реагентов

Рас- тво- рит ь/ раз вес ти	Компо- нент	Разб- а- вите ль	Со- от- но- ше- ни	Замечан- ия	хране- ние	Стаб- иль- ность
---	----------------	---------------------------	--------------------------------	----------------	---------------	------------------------

				е			
	CAL LYO	См. эти- кет ку	DIL BUF	Ко не ч- на я ко нц .. 32 0 нг/ мл	Аликвот ы (PS или PP пробирк и).	< -30 °C	1 месяц
	CONT ROL+ LYO	См. эти- кет ку	DIL BUF		Аликво ы (PS или PP пробирк и).	< -30 °C	1 месяц
12	ENZC ONJ LYO	12 мл	ENZ CO NJD IL		Аликвот ировать (PS или PP пробирк и). Хранить с защище нном от света месте. Избегат ь повторн ых циклов замораж ивания- оттаива ния.	< -30 °C или 18- 25°C	1 месяц или 5 часов
(пример для 32 лунок)							
50 мл	WASH BUF CONC	200 мл	Дист ил- лиро ван- ная вода	1: 5	Аликвот- ы	-	-
1.8 мл	COLR EA A	1.8 мл	COL REA B	1: 2 (1 +1)	Пригото вить (непосре дственн о перед использ	18- 25°C	3 часа

					ованием		
--	--	--	--	--	---------	--	--



1. Вносите указанное количество во флакон.
2. Аккуратно перемешайте вручную в течение нескольких секунд. Избегайте попадания раствора на внутреннюю резиновую часть крышки, так как материал может быть адсорбирован резиной.
3. Оставьте при комнатной температуре не менее чем на 10 минут для полного растворения.
4. Аккуратно перемешайте перед использованием. Избегайте попадания раствора на внутреннюю резиновую часть крышки.

10.2. Подготовка калибровочной кривой

10.2.1. Обычная калибровочная кривая

Концентрация, нг/мл	Разведение	Стандарт
80	Внести 100 мкл стандарта (320 нг/мл) в 300 мкл буфера для разведения и перемешать.	7
40	Внести 100 мкл стандарта 7 в 100 мкл буфера для разведения и перемешать.	6
20	Внести 100 мкл стандарта 6 в 100 мкл буфера для разведения и перемешать.	5
10	Внести 100 мкл стандарта 5 в 100 мкл буфера для разведения и перемешать.	4
5	Внести 100 мкл стандарта 4 в 100 мкл буфера для разведения и перемешать.	3
2.5	Внести 100 мкл стандарта 3 в 100 мкл буфера для разведения и перемешать.	2
0	Буфер для разведения	1

10.2.2. Калибровочная кривая для высокочувствительного анализа.

Концентрация, нг/мл	Разведение	Стандарт
10	Внести 20 мкл стандарта (320 нг/мл) в 620 мкл буфера для разведения и перемешать.	7
5	Внести 150 мкл стандарта 7 в 150 мкл буфера для разведения и перемешать.	6
2.5	Внести 150 мкл стандарта 6 в 150 мкл буфера для разведения и перемешать.	5
1.25	Внести 150 мкл стандарта 5 в 150 мкл буфера для разведения и перемешать.	4
0.625	Внести 150 мкл стандарта 4 в 150 мкл буфера для разведения и перемешать.	3
0.313	Внести 150 мкл стандарта 3 в 150 мкл буфера для разведения и перемешать.	2
0	Буфер для разведения	1

10.3. Разведение образцов

Образцы, концентрация анализата в которых выше. Чем концентрация самого высшего стандарта, должны быть разведены буфером для разведения в PS or PP пробирках, и протестированы еще раз.

11. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

	Обычный диапазон
1	Внесите по 100 мкл буфера для разведения в соответствующие лунки микропланшета.
2	Внесите 10 мкл буфера для разведения в лунку, предназначенную для бланка.
3	Внесите по 10 мкл каждого стандарта, положительного контроля, и образцов сыворотки или плазмы в соответствующие лунки микропланшета. Коротко шейкируйте 30 секунд.
4	Закройте планшет адгезивной пленкой и инкубируйте 20-24 часа при температуре 37°C.
5	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 5 раз по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
6	Добавьте в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
7	Закройте планшет адгезивной пленкой. Инкубируйте 2 часа при температуре 25°C.
8	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 5 раз по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Для внесения субстратного раствора и стоп-раствора по возможности используйте 8-канальный дозатор. Внесение растворов должно выполняться в одном и том же порядке и с одинаковой скоростью. Избегайте образования пузырей.
10	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата ТМВ
11	Инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре (18-25°C).
12	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора. Коротко перемешайте содержимое лунок, аккуратно постучав по краю микропланшета.
13	Убедитесь, что доньшки лунок чистые. Будьте аккуратны, не поцарапайте доньшки лунок, так как это может повлиять на измерения.
14	Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм (длина волны сравнения: 600-650 нм) в течение 60 минут после внесения стоп-раствора.

	Высокочувствительный метод
1	Внесите по 50 мкл буфера для разведения в соответствующие лунки микропланшета.
2	Внесите 50 мкл буфера для разведения в лунку, предназначенную для бланка.
3	Внесите по 50 мкл каждого стандарта, положительного контроля, и образцов сыворотки или плазмы в соответствующие лунки микропланшета. Коротко шейкируйте 30 секунд.
4	Закройте планшет адгезивной пленкой и инкубируйте 20-24 часа при температуре 37°C.
5	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 5 раз по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
6	Добавьте в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
7	Закройте планшет адгезивной пленкой. Инкубируйте 2 часа при температуре 25°C.
8	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку готовым буфером для промывок 5 раз по 400 мкл. После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Для внесения субстратного раствора и стоп-раствора по возможности используйте 8-канальный дозатор. Внесение растворов должно выполняться в одном и том же порядке и

	с одинаковой скоростью. Избегайте образования пузырей.
10	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата ТМВ
11	Инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре (18-25°C).
12	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора. Коротко перемешайте содержимое лунок, аккуратно постучав по краю микропланшета.
13	Убедитесь, что доньшки лунок чистые. Будьте аккуратны, не поцарапайте доньшки лунок, так как это может повлиять на измерения.
14	Измерьте оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм (длина волны сравнения: 600-650 нм) в течение 60 минут после внесения стоп-раствора.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты анализа можно считать достоверными, если процедура анализа была выполнена в полном соответствии с данной инструкцией. Кроме того, необходимо строго соблюдать правила GLP (Good Laboratory Practice, хорошей лабораторной практики) или иных норм качества, установленных в вашей лаборатории. Результаты, полученные при тестировании всех стандартов, входящих в состав набора, должны лежать в диапазонах допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества (QC).

Если эти критерии не выполняются, то постановка считается недействительной и тестирование должно быть выполнено еще раз. Каждая лаборатория должна использовать образцы с известными значениями для дополнительного контроля.

В случае повторного получения недостоверных результатов необходимо проверить следующие технические характеристики: сроки годности реагентов (приготовленных), условия хранения, пипетки, оборудование, условия инкубации и методику промывки.

Рекомендуется участвовать в соответствующих программах внешнего контроля качества.

13. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для получения калибровочной кривой используйте либо автоматический, либо ручной метод расчетов. Для ручного метода на полупологарифмической бумаге постройте график зависимости полученных оптических плотностей Стандартов (ось у, линейная шкала) от концентрации соответствующих Стандартов (ось х, логарифмическая шкала). При автоматических расчетах хорошее соответствие получается при использовании методов кубического сплайна, 4х параметрической регрессии или Logit-Log.

Для расчета калибровочной кривой используйте каждое значение, полученное для стандартов (если значение одного из дублей, полученных для каждого стандарта, резко выпадает, его можно не использовать и учитывать только другое значение).

Концентрацию аналита в образцах можно определить непосредственно из соответствующей калибровочной кривой.

Образцы, для которых были получены значения ОП, превышающие ОП наибольшего стандарта, должны быть разведены, как это описано в п. «Разведение образцов» и проанализированы еще раз.

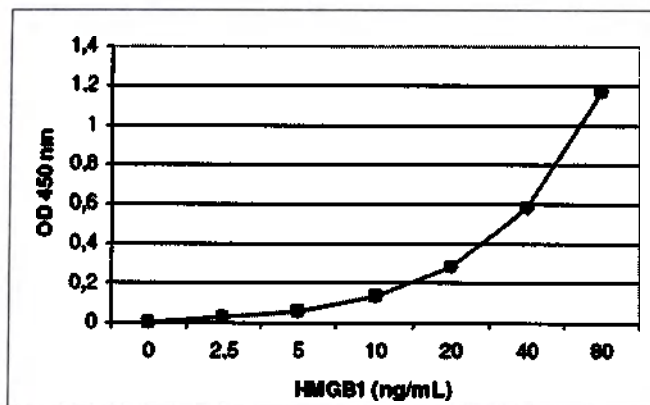
Если образец был разведен, полученное в результате измерения значение необходимо умножить на коэффициент разведения.

Типичная калибровочная кривая для обычного метода:
(Пример. Не использовать для реальных расчетов!)

Стандарт	HMGB1 (нг/мл)	Среднее, ОП
1	0	0.000
2	2.5	0.027
3	5	0.061
4	10	0.137

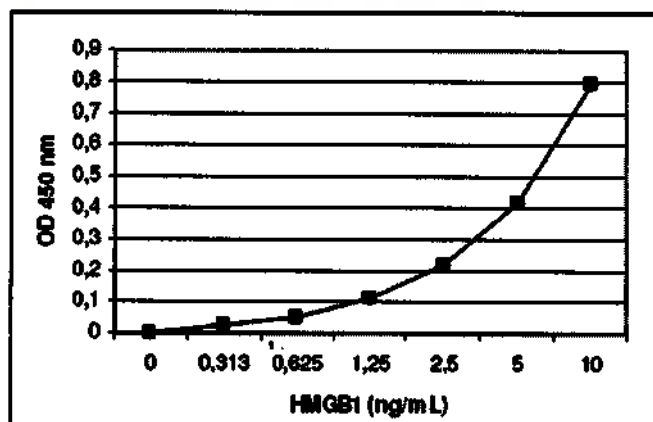
5	20	0.281
6	40	0.585
7	80	1.172

Образцы, концентрация анализта в которых ниже самого низкого стандарта, должны быть протестированы по протоколу высокочувствительного метода.



Типичная калибровочная кривая для высокочувствительного метода:
(Пример. Не использовать для реальных расчетов!)

Стандарт	HMGB1 (нг/мл)	Среднее, ОП
1	0	0.000
2	0.31	0.027
3	0.62	0.052
4	5	0.114
5	1.25	0.218
6	5	0.418
7	10	0.793



14. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

HMGB1 (сыворотка)	Интерпретация
< 1.4 нг/мл	Нормальные
> 1.4 нг/мл	Повышенные

Сами по себе в отдельности результаты не могут служить единственной причиной какого-либо терапевтического заключения. Они должны коррелировать с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами.

15. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Были протестированы образцы сывороток, взятые у 142 практически здоровых людей. Измеренные значения лежали в диапазоне от 0 до 1.8 нг/мл. Верхний предел референсного диапазона составил 1.4 нг/мл (97.5 % процентиль).

N	Среднее, нг/мл	SD, нг/мл	95 % процентиль, нг/мл	97.5 % процентиль, нг/мл	Cut-off	значени я > 1.4 нг/мл
142	0.39	0.42	1.2	1.4	1.4	2.5

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений.

16. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Процедура сбора образцов оказывает значительное влияние на результаты тестирования. См. раздел «Сбор и хранение образцов».

Данные о перекрестной реактивности приведены в разделе «Характеристики метода».

Перечисленные ниже вещества в указанных концентрациях не оказывают значительного влияния (+/- 20% от ожидаемого) на результаты тестирования:

РФ	500 МЕ/мл
Билирубин	50 мг/дл
Хиломикроны	3000 FTU

Не используйте образцы с гемолизом для анализа данным методом. HMGB1 высвобождается из эритроцитов, и это приводит к ложным высоким значениям. Также показано, что гемоглобин влияет на результаты тестирования данным методом, увеличивая получаемые значения.

Недостаточно хорошо центрифугированные образцы, или образцы, загрязненные эритроцитами, могут давать ложные высокие результаты. См. раздел «ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА».

17. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)	Вещество: HMGB2	Перекрестная реактивность (%): < 2.0	Перекрестная реактивность с другими веществами не была протестирована
Аналитическая чувствительность (предел определения)	1.0 нг/мл (обычный метод) 0.2 нг/мл (высокочувствительный метод)	Средний сигнал (нулевого стандарта) + 2.6 SD	
Функциональная чувствительность	0.2 нг/мл (обычный метод) 0.1 нг/мл	Наименьшая концентрация HMGB,1 при определении которой CV ≤ 20%.	

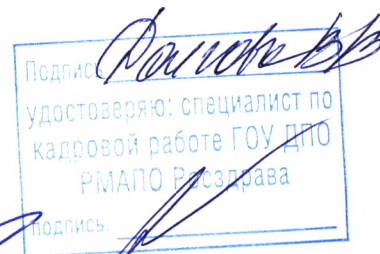
(предел количественного определения)	(высокочувствительный метод)			
Воспроизводимость		Диапазон, нг/мл	CV (%)	
Внутри серии	5 образцов (высокочувствительный метод)	0.2 - 10	10.2 - 3.2	
	6 образцов (обычный метод)	2.3 - 80	13.7 - 5.5	
Воспроизводимость	5 образцов (высокочувствительный метод)	0.37 - 10	10.7 - 1.3	
	4 образцов (обычный метод)	9.7 - 77	13.7 - 7.6	
		Диапазон, нг/мл	Серийное разведение до	Диапазон (%)
Линейность	сыворотка (высокочувствительный метод)	1.3 - 10.5	1:8	90.8 - 115.6
	сыворотка (обычный метод)	2.1 - 103.2	1:16	93.1 - 109.9
Извлечение		Среднее (%)	Диапазон (%)	
	сыворотка (высокочувствительный метод)	93.4	86.6 - 100.2	% Recovery after spiking
	сыворотка (обычный метод)	99.6	94.7 - 104.6	

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2011г.

Всего прошито
и пронумеровано

11 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.

