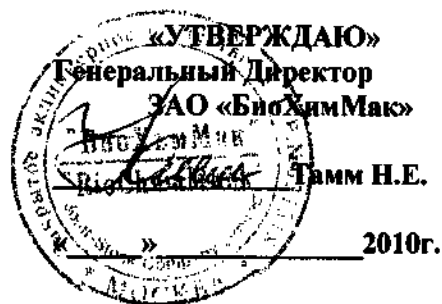


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для измерения уровня человеческого хромогранина А в сыворотке ЭСТРАДИОЛ (17 β -ESTRADIOL)

Иммуноферментный набор для прямого количественного определения 17 β -эстрадиола в сыворотке или плазме.

Для рутинных исследований.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения 17 β -эстрадиола в человеческой сыворотке и плазме.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Эстрадиол (17 β -эстрадиол) является половым гормоном. Это основной человеческий эстроген. Эстрадиол не только оказывает важное воздействие на репродуктивную и половую функции, но также влияет на другие органы, включая структуру кости. У женщин в репродуктивном возрасте большая часть эстрадиола продуцируется яичниками, меньшие количества эстрадиола также продуцируются корой надпочечников. У мужчин эстрадиол продуцируют тестикулы.

В плазме эстрадиол большей частью связан с секс-гормон связывающим глобулином (SHBG), а также альбумином, однако биологической активностью обладает только свободная фракция.

У женщин уровень эстрадиола в сыворотке в первую очередь отражает активность яичников. Во время беременности уровень эстрогенов, в том числе и эстрадиола, монотонно повышается с увеличением срока беременности. Это происходит за счет плацентарной продукции эстрадиола. У взрослых женщин в перименопаузе продукция эстрадиола стимулируется лютеинизирующим гормоном (ЛГ, LH) и фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ, FSH) на протяжении менструального цикла. У взрослых женщин уровень эстрадиола измеряют для оценки фертильности и при нарушениях менструального цикла, а также для мониторинга фолликулярного созревания во время индукции овуляции.

У женщин эстрадиол действует как гормон роста для тканей репродуктивных органов. Развитие вторичных половых признаков у женщин происходит под действием эстрадиола. Эстрадиол также участвует в мужской фертильности.

Эстрадиол участвует в регуляции костного метаболизма. У женщин после наступления менопаузы ускоряется процесс потери костной массы из-за относительного дефицита эстрогена.

Эстрадиол влияет на продукцию многих белков, включая липопротеины, связывающие белки и белки, ответственные за свертываемость крови. Показано, что эстрогены обладают нейропротекторной функцией.

Эстрадиол, обладающий разнообразными активностями, вовлечен в развитие различных злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы, рак эндометрия. Кроме того, существуют некоторые доброкачественные эстроген-зависимые гинекологические заболевания, такие как эндометриоз, such as endometriosis, лейомиома матки, маточное кровотечение uterine bleeding.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

17 β -эстрадиол (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с 17 β -эстрадиолом, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к 17 β -эстрадиолу, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза).

После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты.

Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию 17 β -эстрадиола в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации 17 β -эстрадиола в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты 17 β -эстрадиола STD0 кат. № DCE002/0306-0 STD1 кат. № DCE002/0307-0 STD2 кат. № DCE002/0308-0 STD3 кат. № DCE002/0309-0 STD4 кат. № DCE002/0310-0 STD5 кат. № DCE002/0311-0	6х (1 флакон = 0.5 мл)
2. Конъюгат кат. № DCE002/0302-0 Конъюгат 17 β -эстрадиол-HRP	1 флакон, 22 мл
3. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к 17 β -эстрадиолу, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/0303-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
4. Концентрат буфера для промывок 10х Фосфатный буфер 0,2 М, содержит проклин < 0,002% кат. № DCE054-0	1 флакон, 50 мл
5. Субстрат ТМВ H ₂ O ₂ -ТМВ 0.26г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 15 мл
6. Стоп-раствор (1М фосфорная кислота 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 15 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.
Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 3 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения 17β-эстрадиола в диапазоне от 20 пг/мл до 2000 пг/мл.
- Клиническая значимость определения 17β-эстрадиола может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0, S1, S2, S3, S4, S5)

В наборе поставляются готовые к использованию стандарты со следующими концентрациями 17β-эстрадиола:

S0	S1	S2	S3	S4	S5	
пг/мл	0	20	120	300	600	2000

Стабильность:

Не вскрытые стандарты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора. После вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +2 ÷ 8°C.

5.2. Приготовление конъюгата

Конъюгат готов к использованию. Тщательно перемешайте в течение 5 минут перед использованием. После вскрытия конъюгат стабилен в течение 6 месяцев при +2 ÷ 8°C.

5.3. Приготовление буфера для промывок

Перед использованием разведите содержимое флакона в концентрате буфера для промывок 10х до 500 мл дистиллированной водой в подходящей емкости.

Если требуется приготовить меньший объем буфера для промывок, разведите необходимый объем концентрата буфера для промывок 10х в 10 раз. Разведенный буфера для промывок стабилен в течение 30 дней при 2-8°C. В концентрате буфера для промывок могут образовываться кристаллы. В этом случае тщательно перемешайте концентрат буфера для промывок при комнатной температуре, до полного растворения кристаллов, и, для большей точности, разводите весь концентрат буфера для промывок до объема 500 мл, таким образом, чтобы кристаллы полностью попали в емкость с разведенным буфером, а затем перемешивайте до полного растворения кристаллов.

Подготовка образцов

Определение 17β-эстрадиола может быть выполнено в плазме или в сыворотке. Если тестирование не проводится в день взятия образцов, то они должны храниться при -20°C.

5.4. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 6 стандартов (S0-S5) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Внесите в лунки согласно схеме:

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Образцы		25 мкл	
Стандарты S0-S5	25 мкл		
Конъюгат	200 мкл	200 мкл	

Инкубируйте при 37°C в течение 2 часов. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями эстрадиола для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций.

Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4х-параметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в пг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Референсные значения для 17 β -эстрадиола в сыворотке или плазме:

ЖЕНЩИНЫ:

Фолликулярная фаза: 30 - 100 пг/мл

Пик овуляции: 130 - 350 пг/мл

Лютеиновая фаза: 50 - 180 пг/мл

Менопауза: < 60 пг/мл

ДЕТИ: < 40 пг/мл

МУЖЧИНЫ: < 60 пг/мл

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 7%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 10.4 %.

10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Эстрадиол	100	%
Эстрон	2	%
Эстриол	0.39	%
Тестостерон	0.02	%
Кортизол	< 7х10 ⁻³	%
Прогестерон	< 3х10 ⁻⁴	%
ДГЭА-сульфат	< 1х10 ⁻⁴	%

10.3. Извлечение

Извлечение 50 – 100 – 200 – 400 пг/мл 17 β -эстрадиола, добавленного в образцы, составило в среднем ($\pm$ SD) 98.4% $\pm$ 5.2% относительно исходной концентрации.

10.4 Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация 17 β -эстрадиола, отличная от нулевого стандарта, составляет 15 пг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Корреляция с другим коммерчески доступным методом

Данный метод Diametra определения 17 β -эстрадиола (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения 17 β -эстрадиола. Образцы 28 сывороток были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.988x - 9.87$$

$$r = 0.997 (r^2 = 0.994)$$

* 11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

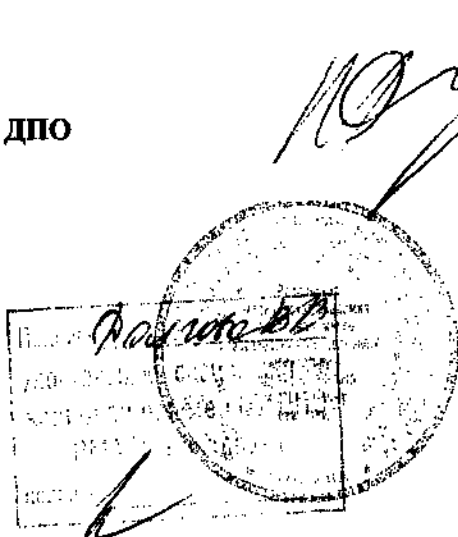
Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (495) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

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



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2010г.

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для измерения уровня 17α ОН PROGESTERONE в сыворотке или плазме человека

Иммуноферментный набор
для прямого количественного определения 17α ОН прогестерона в сыворотке или плазме.

Для рутинных исследований.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения 17α ОН прогестерона в человеческой сыворотке и плазме.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

17-гидроксипрогестерон (17-ОН прогестерон или 17ОНР) является С-21 стероидным гормоном, продуцируемым в надпочечниках и гонадах, в процессе синтеза глюкокортикоидов и половых стероидов sex steroids. Он вырабатывается из прогестерона с при участии фермента 17-гидроксилазы, P450c17, или из 17-гидроксипрегненолона при участии 3β-гидроксистероид дегидрогеназы /Δ5-4 изомеразы.

У 17α -ОНР нет определенной физиологической роли, кроме того, что он является молекулой-предшественником.

Уровень 17α -ОНР в сыворотке зависит от возраста, максимальные уровни наблюдаются в эмбриональный период и непосредственно после рождения. В течение первой недели жизни уровень 17α -ОНР в сыворотке падает в ~50 раз по сравнению с концентрацией в пуповинной крови. Небольшое неустойчивое повышение наблюдается у мальчиков через 30-60 дней после рождения. Уровни у детей обоих полов остаются на постоянном низком уровне, а затем в пубертатный период постепенно нарастают, достигая взрослых уровней, ~100 нг/дл (~3.03 нмоль/л). Как и для кортизола, в норме наблюдаются АСТН-зависимые суточные колебания сывороточного уровня 17α -ОНР, с пиком в утреннее время и минимальной концентрацией ночью.

Кроме того, продукция 17α -ОНР повышается во время лютеиновой фазы менструального цикла. 17-гидроксипрогестерон является прогестинном, во время беременности его уровень повышается в третьем триместре, в основном из-за продукции надпочечниками плода.

Нормальные уровни у детей составляют 3-90 нг/дл у детей, у женщин 15-70 нг/дл перед овуляцией и 35-290 нг/дл в лютеиновой фазе.

Измерение уровня 17-гидроксипрогестерона может быть использовано при обследовании пациентов с подозрением на врожденную гиперплазию надпочечников, так как дефицит ферментов 21-гидроксилазы и 11β-гидроксилазы приводит к накоплению 17ОНР. Наоборот, у некоторых пациентов с дефицитом 17α-гидроксилазы наблюдается очень низкий или неопределяемый уровень 17ОНР.

Повышение уровня 17α -ОНР от базовой линии и/или после стимуляции АСТН также показано при других формах гиперплазии надпочечников.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

17 α ОН прогестерон (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с 17 α ОН прогестероном, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к 17 α ОН прогестерону, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, Энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию 17 α ОН прогестерона в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации 17 α ОН прогестерона в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты 17ОН прогестерона STD0 кат. № DCE002/0406-0 STD1 кат. № DCE002/0407-0 STD2 кат. № DCE002/0408-0 STD3 кат. № DCE002/0409-0 STD4 кат. № DCE002/0410-0 STD5 кат. № DCE002/0411-0	6х (1 флакон = 1 мл)
2. Конъюгат кат. № DCE002/0402-0 Конъюгат 17ОН Progesterone-HRP	1 флакон, 6 мл
3. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к 17 α ОН прогестерону, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/0403-0	1 планшет с ломаемым и стрипами
4. Субстрат ТМВ H ₂ O ₂ -ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор (1М фосфорная кислота 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 3 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения 17αОН прогестерона в диапазоне от 0.2 нг/мл до 19.2 нг/мл.
- Клиническая значимость определения 17αОН прогестерона может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0,S1,S2,S3,S4,S5)

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями 17α ОН прогестерона:

S0	S1	S2	S3	S4	S5	
нг/мл	0	0.2	0.4	1.6	6.4	19.2

Стабильность: до истечения срока годности набора, указанного на этикетке.

После вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +4°C .

5.2. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 6 стандартов (S0-S5) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Стандарты S0-S5	50 мкл		
Образцы		50 мкл	
Конъюгат	50 мкл	50 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями 17ОН прогестерона для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Характеристики метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь доннышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций.

Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4хпараметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в нг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В образцах сыворотки или плазмы были получены следующие референсные значения концентрации 17 α ОН прогестерона:

ЖЕНЩИНЫ:	фолликулярная фаза	0.2 - 1.3 нг/мл
	лютеиновая фаза	1.0 - 4.5 нг/мл
	менопауза	0.2 - 0.9 нг/мл
МУЖЧИНЫ:		0.2 - 2.3 нг/мл
ДЕТИ:		0.2 - 0.9 нг/мл

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 5.7%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 9%.

10.2. Извлечение

Извлечение 1 – 2 – 4 нг/мл 17ОН прогестерона, добавленного в образцы, составило в среднем ($\pm$ SD) $99.7\% \pm 3.4\%$ по отношению к исходной концентрации.

10.3. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

17 αОН прогестерон	100 %
17 αОН прогненолон	1.3 %
Прогестерон	1.2 %
Кортизол	2×10^{-2} %
Холестерин	8×10^{-4} %

10.4. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация 17ОН прогестерона, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.1 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.5. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra 17ОН прогестерон (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения 17ОН прогестерона. Образцы сывороток 14 женщин, 8 детей и 14 мужчин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам.

$$y = 0.857x + 0.06$$

$$r = 0.993 (r^2 = 0.986)$$

10.6. Хук-эффект

При тестировании данным методом определения 17ОН прогестерона, основанным на конкурентном ИФА, хук-эффект не был обнаружен для концентраций до 40.5 нг/мл.

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ОШИБОК / РЕКОМЕНДАЦИИ

Нет колориметрической реакции

- контаминация конъюгата и /или субстрата

- ошибка при выполнении протокола метода (например, случайное пипетирование реагентов в неправильной последовательности, или не из тех флаконов, и т.д.)

Слишком низкая реакция (низкие оптические плотности)

- несоответствующий конъюгат (например, не из данного набора)

- слишком короткое время инкубации, низкая температура инкубации

Слишком сильная реакция (низкие оптические плотности)

- несоответствующий конъюгат (например, не из данного набора)

- слишком длинное время инкубации, высокая температура инкубации

- низкое качество воды, используемой для промывок (плохая очистка воды)

- недостаточная промывка (конъюгат не полностью удален из лунок)

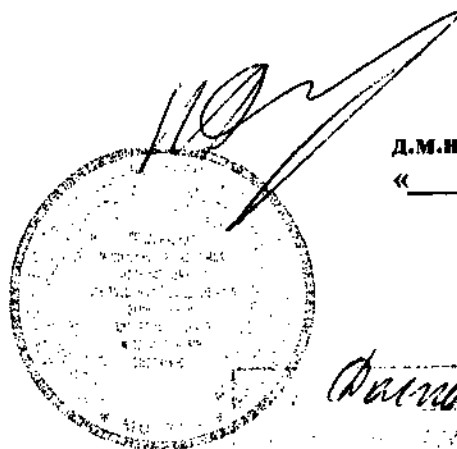
Неожиданные резкие отклонения значений

- контаминация пипеток, наконечников или контейнеров
- недостаточная промывка (конъюгат не полностью удален из лунок)
- реагенты и/или стрипы не нагреты до комнатной температуры перед использованием
- микропланшетный вошер некорректно выполняет промывку (рекомендация: прочистить гребенку)
- не постоянные условия инкубаций (время, температура)
- контроли и образцы не вносятся в одной последовательности и с одинаковыми интервалами времени (проверьте порядок пипетирования)
- отклонения, связанные с квалификацией персонала

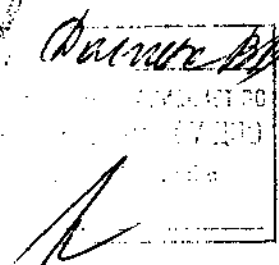
Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,
 ЗАО БиоХимМак
 Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
 9392421, 9395808,
 факс (495) 939-09-97.
 e-mail: info@biochemmack.ru

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



д.м.н., профессор Долгов В.В.
 «___» _____ 2010г.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для измерения уровня свободного эстриола в сыворотке или плазме FREE ESTRIOL

Иммуноферментный набор
для прямого количественного определения свободного эстриола в сыворотке или плазме.

Для рутинных исследований.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения свободного эстриола в человеческой сыворотке и плазме.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Эстриол является одним из трех основных эстрогенов, продуцируемых в организме человека. Значительные количества эстриола продуцируются только во время беременности, так как он продуцируется плодом.

Во время беременности выработка эстриола зависит от функционирования фетоплацентарного комплекса. Фетоплацентарная продукция эстриола ведет к монотонному возрастанию его уровня в материнском кровотоке, концентрация эстриола достигает максимума в последнем триместре, на несколько порядков превышая уровень, определяемый у небеременных женщин. В материнском кровотоке эстриол быстро связывается в печени и затем экскретируется с мочой, период полужизни составляет ~20 минут. Так как нормальная выработка эстриола зависит от целостности фетоплацентарной циркуляции и метаболизма плода, уровень эстриола в материнском кровотоке используется для мониторинга развития плода во время беременности, особенно в третьем триместре. ДНЕА (дегидроэпиандростерон) вырабатывается в коре надпочечников плода, и преобразуется в эстриол в плаценте. Ненормально низкий уровень эстриола у беременной женщины может указывать на проблемы развития плода. Уровень эстриола у женщин значительно не изменяется после менопаузы, и незначительно отличается от уровня эстриола у мужчин.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Свободный эстриол (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с эстриолом, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к эстриолу, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках. Концентрацию свободного эстриола в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации свободного эстриола в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты свободного эстриола STD1 кат. № DCE002/0707-0 STD2 кат. № DCE002/0708-0 STD3 кат. № DCE002/0709-0 STD4 кат. № DCE002/0710-0	4х (1 флакон = 1 мл)
2. Инкубационный буфер Фосфатный буфер 50 mM pH 7.4; BSA 1 г/л кат. № REF DCE001-0	1 флакон = 30 мл
3. Конъюгат кат. № DCE002/0702-0 Конъюгат эстриол-HRP	1 флакон, 0,4 мл
4. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к эстриолу, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/0703-0	1 планшет с покрываемым и стрипами
5. Субстрат ТМВ H2O2-ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H2O2 с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения свободного эстриола в диапазоне от 0.1 нг/мл до 12.0 нг/мл.
- Если концентрация свободного эстриола в образце превышает 12 нг/мл, разведите образец сыворотки (1 + 3) буфером для инкубации.

- При расчете результатов учитывайте коэффициент разведения.
- Клиническая значимость определения свободного эстриола может быть снижена, если пациент получает натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S1,S2,S3,S4)

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями свободного эстриола:

S1	S2	S3	S4	
нг/мл	0.1	1.0	4.0	12.0

Стабильность: после вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +4°C .

5.2. Подготовка конъюгата

Приготовьте конъюгат непосредственно перед использованием.

Внесите 10 мкл концентрата конъюгата (реагент 3) в 2.0 мл буфера для инкубации (реагент 2).

Аккуратно перемешивайте в течение 5 минут, на крутящемся миксере.

Стабильность: после разведения в течение 3 часов при комнатной температуре.

5.3. Подготовка образцов

Определение свободного эстриола может быть выполнено в плазме или в сыворотке. Если тестирование не проводится в день взятия образцов, то они должны храниться при -20°C.

5.3. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 4 стандартов (S1-S4), две лунки для В0 и по две лунки для каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	В0	Стандарт	Образец	Бланк
буфер для инкубации	20 мкл			
Образцы			20 мкл	
Стандарты S1-S4		20 мкл		
Разведенный конъюгат	200 мкл	200 мкл	200 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.				
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.				
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (Е) при длине волны 450 нм против бланка.				

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями свободного эстриола для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих поставок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать на незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь доньшек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций. Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4хпараметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации, в нг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрация свободного эстриола/неделя беременности	Сыворотка или плазма, нг/мл	
	медиана	диапазон
14°	0.6	(0.2 - 3.0)
15°	0.8	(0.2 - 3.5)
16°	1.0	(0.3 - 4.2)

17°	1.2	(0.4 - 5.2)
18°	1.4	(0.4 - 5.8)
19°	1.6	(0.4 - 6.2)
20°	2.0	(0.4 - 6.8)
22°	2.5	(0.4 - 9.1)
24°	2.7	(0.4 - 9.1)
26°	4.0	(1.9 - 9.5)
28°	5.0	(2.2 - 10.1)
30°	5.0	(2.0 - 10.8)
32°	5.6	(2.5 - 11.3)
34°	5.8	(2.2 - 12.7)
36°	9.0	(2.5 - 25.0)
37°	10.6	(3.6 - 25.3)
38°	15.1	(6.6 - 29.7)
39°	13.7	(6.7 - 25.3)
40°	14.8	(7.2 - 22.9)
41°	17.4	(8.8 - 31.5)

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 4.8%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 8.8%.

10.2. Извлечение

Извлечение 1 – 2 – 4 – 8 нг/мл добавленного в образцы эстриола в среднем составило ($\pm$ SD) 101.6% $\pm$ 6.8% по отношению к исходной концентрации.

10.3. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация свободного эстриола, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.05 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Свободный эстриол	100%
16 эпи-эстриол	10.5%
15 α ОН-эстриол	7.0%
Эстриол 3 сульфат	2.0%
Эстрадиол	0.1%
17 эпи-эстриол	< 1x10 ⁻² %
Эстриол 3 α глюкуронат	< 1x10 ⁻² %
Estriol 16 α глюкуронат	< 1x10 ⁻² %
Эстрон	< 1x10 ⁻⁴ %

10.5. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra свободный эстриол (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения свободного эстриола. Образцы сывороток 33 женщин и 30 мужчин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.958x + 0.05$$

$$r = 0.995 (r^2 = 0.99)$$

10.6. Хук-эффект

При тестировании данным методом определения свободного эстриола, основанным на конкурентном ИФА, хук-эффект не был обнаружен для концентраций до 40 нг/мл.

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

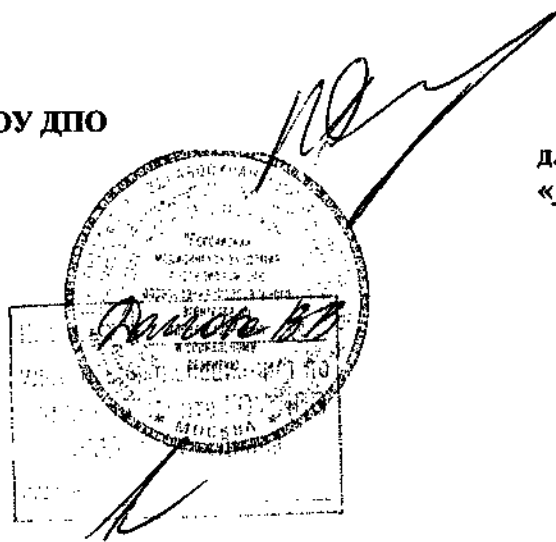
Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

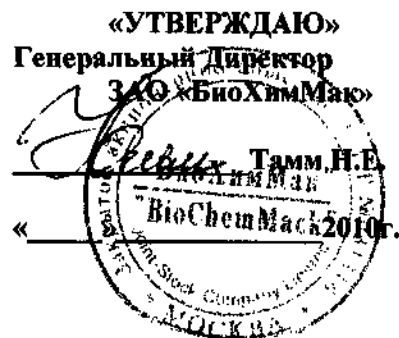
119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (495) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

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



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«____» _____ 2010г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для измерения уровня FREE TESTOSTERONE в сыворотке или плазме человека

Иммуноферментный набор для прямого количественного определения свободного тестостерона в сыворотке или плазме. Для рутинных исследований.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения свободного тестостерона в человеческой сыворотке и плазме.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Тестостерон – это стероидный гормон группы андрогенов. В первую очередь тестостерон секретируется в яичках у мужчин и яичниках у женщин, хотя незначительные количества гормона также секретируются надпочечниками. Этот анаболический стероид является важным мужским половым гормоном. И у мужчин, и у женщин он играет ключевую роль в состоянии здоровья и самочувствии.

Только 1-2% циркулирующего тестостерона существует в несвязанной, или свободной, форме. Большая часть гормона, приблизительно 60%, связана с SHBG с высокой аффинностью, а оставшаяся часть связана с альбумином. Обе фракции, свободная и связанная с альбумином, могут быть биологически активны, тогда как SHBG эффективно ингибирует действие тестостерона.

Эффекты, оказываемые тестостероном, могут быть классифицированы как вирилизирующий и анаболический эффекты. Анаболический эффект включает рост мышечной массы и силы, повышение плотности и прочности кости, стимуляцию роста и развитие скелета. Вирилизирующий эффект включает созревание половых органов. У мужчин уровень тестостерона постепенно снижается с возрастом.

Измерение свободной или несвязанной фракции сывороточного тестостерона было предложено для оценки физиологически биоактивного гормона. Уровень свободного тестостерона повышен у женщин при гиперандрогенизме, ассоциированном с гирсутизмом, в присутствии или отсутствии синдрома поликистозных яичников. Кроме того, измерение свободного тестостерона может быть более значимо, чем определение общего тестостерона в ситуации, когда уровень SHBG повышен или снижен (например, гипотиреоз или ожирение).

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Свободный тестостерон (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с тестостероном, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к тестостерону, сорбированных в лунках микропланшета (твёрдая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию свободного тестостерона в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации свободного тестостерона в образцах.

Примерно 60 % тестостерона, присутствующего в кровотоке, связаны с SHBG, меньший процент связан с другим белком. Только измерение свободного тестостерона (составляющего < 1% от общего тестостерона) позволяет оценить биологическую активность гормона.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты свободного тестостерона STD0 кат. № DCE002/1506-0 STD1 кат. № DCE002/1507-0 STD2 кат. № DCE002/1508-0 STD3 кат. № DCE002/1509-0 STD4 кат. № DCE002/1510-0 STD5 кат. № DCE002/1511-0	6х (1 флакон = 1 мл)
2. Конъюгат кат. № DCE002/1502-0 Конъюгат тестостерон-HRP	1 флакон, 6 мл
3. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к тестостерону, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/1503-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
4. Субстрат ТМВ H ₂ O ₂ -ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 3 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения свободного тестостерона в диапазоне от 0.10 пг/мл до 100.0 пг/мл.

- Клиническая значимость определения свободного тестостерона может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0,S1,S2,S3,S4,S5)

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями свободного тестостерона:

S0	S1	S2	S3	S4	S5	
пг/мл	0	0.2	1.0	4.0	20.0	100.0

Стабильность: после вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +4°C.

5.2. Подготовка образцов

Определение свободного тестостерона может быть выполнено в плазме или в сыворотке, взятой натощак. Если тестирование не проводится в день взятия образцов, то они должны храниться при -20°C.

5.3. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 6 стандартов (S0-S5) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Стандарты S0-S5	20 мкл		
Образцы		20 мкл	
Конъюгат	200 мкл	200 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями свободного тестостерона для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать на незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций.

Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4хпараметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в пг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

	медиана	Среднее $\pm 1SD$, пг/мл	Диапазон, пг/мл
Здоровые мужчины	14	13 ± 7	4.5 - 42
Женщины:			
Детородный период	1.3	1.4 ± 0.9	ND - 4.1
Прием оральных контрацептивов	0.9	1.1 ± 0.6	0.3 - 2.0
постменопауза	0.8	0.9 ± 0.5	0.1 - 1.7

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 6.4%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 8%.

10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

аналит	% перекрестной реактивности
Тестостерон	100
DHT	0.006
Андростендион	0.0005
Андростерон	0
DHEA-S	0
Кортизол	0
Кортизон	0
17α эстрадиол	0
Эстрон	0
Преднизон	0
17α этинилэстрадиол	0
норгестрел	0

10.3. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация свободного тестостерона, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.002 пг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra свободный тестостерон (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения свободного тестостерона. Образцы сывороток 69 женщин и 26 мужчин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.47 x + 0.378$$

$$r = 0.86$$

10.5. Хук-эффект

При тестировании данным методом определения свободного тестостерона, основанным на конкурентном ИФА, хук-эффект не был обнаружен для концентраций до 400 пг/мл.

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

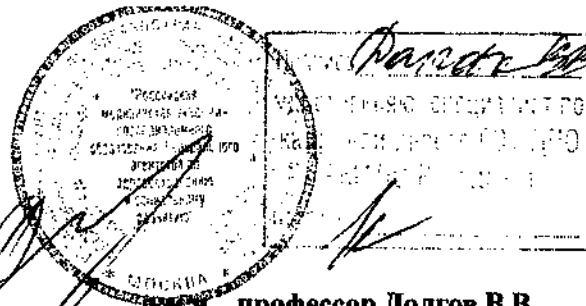
Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,
 ЗАО БиоХимМак
 Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
 9392421, 9395808,
 факс (495) 939-09-97.
 e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

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


 Д.М.И., профессор Долгов В.В.
 «___» _____ 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для определения циркулирующих иммунных комплексов (CIC) в сыворотке или плазме CIC C1Q

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения циркулирующих иммунных комплексов (CIC) в человеческой сыворотке и плазме.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

C3D-содержащие иммунные комплексы (CIC) на первом этапе фиксируются анти-C1Q антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета.

Затем, для количественной оценки комплексов IgG-CIC используют специфические анти-IgG антитела, конъюгированные с пероксидазой и ТМВ в качестве ферментного субстрата.

Количество продукта, образовавшегося в результате ферментной реакции, измеренное считыванием абсорбции в лунках при длине волны 450 нм, пропорционально уровню IgG-CIC комплексов, связавшихся с твердой фазой на первом этапе анализа.

2. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

2.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарт: человеческий агрегированный IgG STD1 (1 флакон), 1 мл, кат. № DCE002/1607-0 STD2 (1 флакон), 1 мл, кат. № DCE002/1608-0 STD3 (1 флакон), 1 мл, кат. № DCE002/1609-0	1x3 флакона, по 1 мл
2. Инкубационный буфер, кат. № DCE008-0 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 1 г/л BSA)	1 флакон, 50 мл
3. Конъюгат, кат. № DCE002/1602-0 Конъюгат анти-IgG антител с пероксидазой.	1 флакон, 0.4 мл
4. Буфер для разведения конъюгата, кат. № DCE009-0 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 1 г/л BSA)	1 флакон, 20 мл
5. 96-луночный микропланшет, покрытый анти-C3D, кат. № DCE002/1603-0	1 планшет с ломае- мыми стрипами
6. Концентрат буфера для промывок, кат. № DCE006/1606-0 50 мМ фосфатный буфер pH 7.4; tween-20 20 г/л	1 флакон, 20 мл
7. Субстрат ТМВ, кат. № DCE004-0 H2O2-ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
8. Стоп-раствор, кат. № DCE005-0 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл

Замечание

- Все реагенты и микропланшет должны храниться при 2÷8°C в темноте и должны быть использованы до окончания срока годности, указанного на упаковке.
- Открывайте пакет с микропланшетом только после того, как он достигнет комнатной температуры, и доставайте только то количество стрипов, которое необходимо для текущей постановки.
- Неиспользованные стрипы поместите в оригинальный пакет и тщательно его закройте.

2.3 Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

2.4. Дополнительные материалы и оборудование

Стеклянные или пластиковые пробирки (приблизительно на 5 мл);

Микропипетки, многоканальные пипетки переменного объема или степперы; инкубатор на 37°C;

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с возможностью считывания при длине волны 450 нм.

2.5 Приготовление реагентов

Разведение конъюгата

Для тестирования каждой 16 лунок разведите 20 мкл конъюгата (реагент 2) в 2.0 мл буфера для разведения конъюгата (реагент 3).

Тщательно перемешайте, не допускайте образования пены. Разведенный конъюгат стабилен в течение 3 часов при 18-25°C.

Буфер для промывок

Разведите концентрат буфера для промывок в 180 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешайте. Готовый буфер для промывок стабилен до истечения срока годности набора при 18-25°C.

3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный метод может быть использован для анализа образцов сыворотки или плазмы. Если образцы не тестируются сразу после сбора, то они должны храниться при -20°C. Не допускайте повторного замораживания/оттаивания образцов.

Внесите в пробирку:

Сыворотка/плазма: 10 мкл

Инкубационный буфер (реагент 1): 500 мкл

Аккуратно и тщательно перемешайте.

4. ПРОЦЕДУРА

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из стандартов и образцов.

Реагент	Стандарты	Образцы
Разведенные образцы		100 мкл
Стандарты S0-S2	100 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут. Удалите содержимое всех лунок; дважды промойте лунки буфером для промывок, используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу.		
Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут. Удалите содержимое всех лунок; дважды промойте лунки буфером для промывок, используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу.		
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут.		
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм во всех лунках (в течение 30 минут после внесения стоп-раствора), после выставления ридера на 0 по S0		

5. КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ – РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрации стандартов, поставляемых в наборе:

S0: 0 мкг эквив./мл

S1: 16 мкг эквив./мл

S2: 64 мкг эквив./мл

5.1 Рассчитайте среднее значение абсорбции (E_m) для каждой точки калибровочной кривой и для каждого образца.

5.2 Калибровочная кривая

Постройте точки стандартов S1 – S2, используя концентрации и полученные средние значения E_m и проведите линию через полученные точки.

5.3 Расчет результатов

Используя значения E_m , полученные для образцов, рассчитайте соответствующие значения концентрации агрегированных IgG, в мкг эквив./мл, интерполяцией из калибровочной кривой.

6. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результат считается отрицательным, если уровень агрегированных IgG в образце ниже 16 мкг эквив./мл.

Результат считается сомнительным, если уровень агрегированных IgG в образце находится в диапазоне 16 – 18 мкг эквив./мл.

Результат считается положительным, если уровень агрегированных IgG в образце выше 18 мкг эквив./мл.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

7.1 Чувствительность

Чувствительность данного метода составляет 2 мкг эквив./мл агрегированных IgG.

7.2 Специфичность

Данным методом C1Q ELISA Dia.Metra были протестированы 85 образцов сыворотки и плазмы, собранных у здоровых людей и людей без симптомов заболевания.

Общая специфичность метода составила 97 %. Средняя концентрация C1C для здоровых людей и людей без признаков заболевания составила 5.0 мкг эквив./мл.

7.3 Сравнительный анализ

Данным методом C1Q ELISA Dia.Metra и другим коммерчески доступным ИФА методом были протестированы 65 образцов сыворотки и плазмы, собранных у пациентов с системной красной волчанкой (SLE), ревматоидным артритом (RA) и другими заболеваниями.

Общая согласованность методов составила 88 %.

8. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

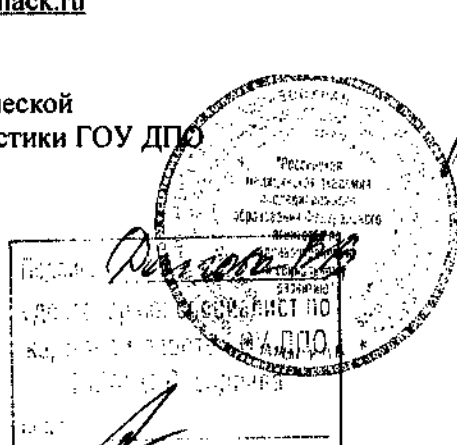
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2010г.

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора определения циркулирующих иммунных комплексов (CIC) в сыворотке или плазме CIC C3D.

НАЗНАЧЕНИЕ

- Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения циркулирующих иммунных комплексов (CIC) в человеческой сыворотке и плазме.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

C3D-содержащие иммунные комплексы (CIC) на первом этапе фиксируются апти-C3D антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета.

Затем, для количественной оценки комплексов IgG-CIC используют специфические анти-IgG антитела, конъюгированные с пероксидазой и TMB в качестве ферментного субстрата.

Количество продукта, образовавшегося в результате ферментной реакции, измеренное считыванием абсорбции в лунках при длине волны 450 нм, пропорционально уровню IgG-CIC комплексов, связавшихся с твердой фазой на первом этапе анализа.

2. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

2.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарт: человеческий агрегированный IgG STD1 (1 флакон), 1 мл, кат. № DCE002/1707-0 STD2 (1 флакон), 1 мл, кат. № DCE002/1708-0 STD3 (1 флакон), 1 мл, кат. № DCE002/1709-0	1х3 флакона, по 1 мл
2. Инкубационный буфер, кат. № DCE008-0 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 1 г/л BSA)	1 флакон, 50 мл
3. Конъюгат, кат. № DCE002/1702-0 Конъюгат анти-IgG антител с пероксидазой.	1 флакон, 0.4 мл
4. Буфер для разведения конъюгата, кат. № DCE009-0 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 1 г/л BSA)	1 флакон, 20 мл
5. 96-луночный микропланшет, покрытый анти-C3D, кат. № DCE002/1703-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
6. Концентрат буфера для промывок, кат. № DCE006/1706-0 50 мМ фосфатный буфер pH 7.4; tween-20 20 г/л	1 флакон, 20 мл
7. Субстрат TMB, кат. № DCE004-0 H2O2-TMB 0.25г/л (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
8. Стоп-раствор, кат. № DCE005-0 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл

Замечание

- Все реагенты и микропланшет должны храниться при 2÷8°C в темноте и должны быть использованы до окончания срока годности, указанного на упаковке.
- Открывайте пакет с микропланшетом только после того, как он достигнет комнатной температуры, и доставайте только то количество стрипов, которое необходимо для текущей постановки.
- Неиспользованные стрипы поместите в оригинальный пакет и тщательно его закройте.

2.2 Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

2.3. Дополнительные материалы и оборудование

Стеклянные или пластиковые пробирки (приблизительно на 5 мл);

Микропипетки, многоканальные пипетки переменного объема или степперы; инкубатор на 37°C;

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с возможностью считывания при длине волны 450 нм.

2.4 Приготовление реагентов

Разведение конъюгата

Для тестирования каждой 16 лунок разведите 20 мкл конъюгата (реагент 2) в 2.0 мл буфера для разведения конъюгата (реагент 3).

Тщательно перемешайте, не допускайте образования пены. Разведенный конъюгат стабилен в течение 3 часов при 18-25°C.

Буфер для промывок

Разведите концентрат буфера для промывок в 180 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешайте. Готовый буфер для промывок стабилен до истечения срока годности набора при 18-25°C.

3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный метод может быть использован для анализа образцов сыворотки или плазмы. Если образцы не тестируются сразу после сбора, то они должны храниться при -20°C. Не допускайте повторного замораживания/оттаивания образцов.

Внесите в пробирку:

Сыворотка/плазма: 10 мкл

Инкубационный буфер (реагент 1): 500 мкл

Аккуратно и тщательно перемешайте.

4. ПРОЦЕДУРА

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из стандартов и образцов.

Реагент	Стандарты	Образцы
Разведенные образцы		100 мкл
Стандарты S0-S2	100 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут. Удалите содержимое всех лунок; дважды промойте лунки буфером для промывок, используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу.		
Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут. Удалите содержимое всех лунок; дважды промойте лунки буфером для промывок, используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу.		
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22-28°C в течение 15 минут.		
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм во всех лунках (в течение 30		

минут после внесения стоп-раствора), после выставления ридера на 0 по S0

5. КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ – РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрации стандартов, поставляемых в наборе:

S0: 0 мкг эквив./мл

S1: 16 мкг эквив./мл

S2: 64 мкг эквив./мл

5.1 Рассчитайте среднее значение абсорбции (Em) для каждой точки калибровочной кривой и для каждого образца.

5.2 Калибровочная кривая

Постройте точки стандартов S1 – S2, используя концентрации и полученные средние значения Em и проведите линию через полученные точки.

5.3 Расчет результатов

Используя значения Em, полученные для образцов, рассчитайте соответствующие значения концентрации агрегированных IgG, в мкг эквив./мл, интерполяцией из калибровочной кривой.

6. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результат считается отрицательным, если уровень агрегированных IgG в образце ниже 16 мкг эквив./мл.

Результат считается сомнительным, если уровень агрегированных IgG в образце находится в диапазоне 16 – 18 мкг эквив./мл.

Результат считается положительным, если уровень агрегированных IgG в образце выше 18 мкг эквив./мл.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

7.1 Чувствительность

Чувствительность данного метода составляет 2 мкг эквив./мл агрегированных IgG.

7.2 Специфичность

Данным методом C3d ELISA Dia.Metra были протестированы 85 образцов сыворотки и плазмы, собранных у здоровых людей и людей без симптомов заболевания.

Общая специфичность метода составила 97 %. Средняя концентрация CIC для здоровых людей и людей без признаков заболевания составила 5.0 мкг эквив./мл.

7.3 Сравнительный анализ

Данным методом C3d ELISA DiaMetra и другим коммерчески доступным ИФА методом были протестированы 65 образцов сыворотки и плазмы, собранных у пациентов с системной красной волчанкой (SLE), ревматоидным артритом (RA) и другими заболеваниями.

Общая согласованность методов составила 88 %.

8. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

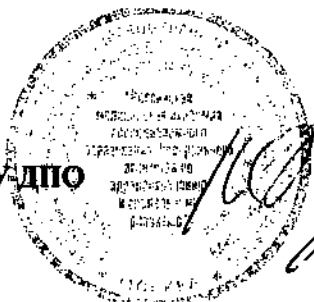
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАНО Росздрава»

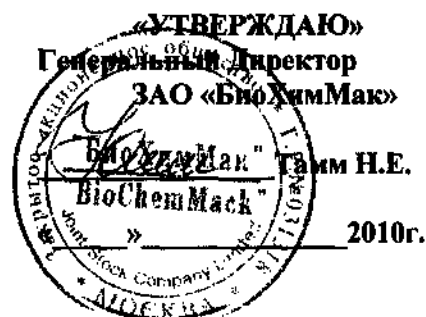


Долгов В.В.

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2010г.

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для количественного определения кортизола в моче.
URINARY CORTISOL

НАЗНАЧЕНИЕ

- Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения кортизола в моче.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Кортизол – это стероидный гормон, секретируемый корой надпочечника в ответ на гормон АКТГ (продуцируемый гипофизом). Он участвует в ответе на стресс, повышает кровяное давление, уровень сахара в крови, может вызывать бесплодие у женщин и подавлять иммунную систему.

Кортизол действует через специфические внутриклеточные рецепторы и влияет на многие физиологические процессы, включая функцию иммунной системы, регуляцию уровня глюкозы, сосудистый тонус, утилизацию субстрата и костный метаболизм. большей частью кортизол экскретируется с мочой, в несвязанной (свободной) форме.

В плазме кортизол связан с кортикостероид-связывающим глобулином (CBG, транскотин), с высокой аффинностью, и альбумином. Для большинства рецепторов доступен только свободный кортизол.

Эти нормальные эндогенные функции лежат в основе физиологических последствий хронического стресса – продолжительная секреция кортизола приводит к потере мышечной массы, гипергликемии и подавлению иммунного/воспалительного ответов. К тем же последствиям приводит длительный прием глюкокортикоидов.

Фракция свободного кортизола представляет собой метаболически активный кортизол. В норме менее 1% экскретируется с мочой. При патологии (например, синдром Кушинга) уровень свободного кортизола в моче повышен, так как CBG не связывает избыточный кортизол плазмы, и он удаляется с мочой.

Во время беременности или терапии препаратами эстро-прогестогена повышение кортизола в плазме связано с увеличением продукции транспортного белка, но уровень свободного кортизола в моче остается в норме, указывая на правильное функционирование. Данный тест очень полезен для оценки ренальной функции, так как он определяет свободный кортизол – т.е. метаболически активную форму. Кроме того, измерение свободного кортизола в моче является одним из лучших тестов для диагностики синдрома Кушинга.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Кортизол (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с кортизолом, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к кортизолу, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию кортизола в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации свободного кортизола в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты свободного кортизола STD0 кат. № DCE002/1806-0 STD1 кат. № DCE002/1807-0 STD2 кат. № DCE002/1808-0 STD3 кат. № DCE002/1809-0 STD4 кат. № DCE002/1810-0	5х (1 флакон = 1 мл)
2. Инкубационный буфер кат. № DCE001-0 Фосфатный буфер 50 мМ рН 7.4; BSA 1 г/л	1 флакон, 100 мл
3. Конъюгат кат. № DCE002/1802-0 Конъюгат кортизол-HRP	1 флакон, 0,4 мл
4. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к кортизолу, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/1803-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
5. Субстрат ТМВ H ₂ O ₂ -ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
6. Стоп-раствор (1М фосфорная кислота 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл
7. Контроль низкого уровня, кат. № DCE045/1801-0	1 флакон, 1 мл
8. Контроль высокого уровня, кат. № DCE045/1802-0	1 флакон, 1 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения свободного кортизола в диапазоне от 10 пг/мл до 500 пг/мл.
- Клиническая значимость определения свободного кортизола может быть снижена, если пациент получает кортикостероиды или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0,S1,S2,S3,S4,S5)

- В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями свободного кортизола:

S0	S1	S2	S3	S4	
пг/мл	0	5,0	25,0	75,0	250,0

Так как стандарты предварительно разведены, а образцы должны быть разведены, при расчете результатов необходимо использовать следующие концентрации:

S0	S1	S2	S3	S4	
пг/мл	0	10	50	150	500

Стабильность: после вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +4°C.

5.2. Подготовка конъюгата

Готовьте непосредственно перед использованием.

- Внесите 10 мкл конъюгата (реагент 3) в 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 2). Тщательно перемешайте. Готовый раствор стабилен 3 часа при комнатной температуре.

5.3. Подготовка образцов

Необходимо собрать суточную мочу в один контейнер, тщательно перемешать. Образцы мочи, которые не будут протестированы сразу, должны храниться при 2 ÷ 8°C или при -20°C, если срок хранения превышает одну неделю. Разведите образцы мочи (1 + 1) инкубационным буфером (например, 100 мкл + 100 мкл)

5.4. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из стандартов (S0-S4) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

	Стандарт/к онтроль	Образ ец	Бланк
Разведенный образец	---	10 мкл	---
S0-S4/ Контроль	10 мкл	---	---
Конъюгат	300 мкл	300 мкл	---
Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 400 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп- раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями кортизола для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая

лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать на незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций. Проведите оптимальную кривую через полученные точки (например, 4хпараметрическая регрессия). Так как стандарты предварительно разведены, а образцы должны быть разведены, при расчете результатов необходимо использовать следующие концентрации:

S0	S1	S2	S3	S4	
пг/мл	0	10	50	150	500

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой, в нг/мл.

Для расчета концентрации кортизола в моче, полученное из калибровочной кривой значение скорректируйте по общему объему собранной суточной мочи:

нг/мл x объем (мл) мочи 24 ч / 1.000 = мкг кортизола /24 ч

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

50 – 190 мкг/24 часа

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 7.4%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 7.8%.

10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Кортизол	100%
Кортизон	10.8%
11-α-дезоксикортизол	18.7%
Кортикостерон	2.4%
Прогестерон	0.1%
Альдостерон	1x10 ⁻² %
11-α ОН прогестерон	1x10 ⁻² %
Холестерин	< 1x10 ⁻⁶ %

10.3. Извлечение

Извлечение 50 – 100 – 200 – 400 нг/мл кортизола в моче, добавленного в образцы составило в среднем ($\pm$ SD) 105% $\pm$ 7.1% по сравнению с исходной концентрацией.

10.4. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация свободного кортизола, отличная от нулевого стандарта, составляет 2.0 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.5. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra свободный кортизол (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения свободного кортизола. Образцы сывороток 23 женщин и 27 мужчин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 1.1x - 1.6$$

$$r = 0.976 (r^2 = 0.948)$$

10.6. Хук-эффект

При тестировании данным методом определения свободного кортизола, основанным на конкурентном ИФА, хук-эффект не был обнаружен для концентраций до 1000 нг/мл.

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

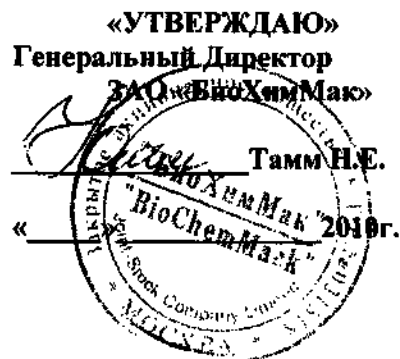
Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (495) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

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

10/10
д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2010г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для для прямого количественного определения общего эстриола в сыворотке или плазме TOTAL ESTRIOЛ

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения общего эстриола в человеческой сыворотке и плазме.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Эстриол является одним из трех основных эстрогенов, продуцируемых в организме человека. Значительные количества эстриола продуцируются только во время беременности, так как он продуцируется плодом.

Во время беременности выработка эстриола зависит от функционирования фетоплацентарного комплекса. Фетоплацентарная продукция эстриола ведет к монотонному возрастанию его уровня в материнском кровотоке, концентрация эстриола достигает максимума в последнем триместре, на несколько порядков превышая уровень, определяемый у небеременных женщин. В материнском кровотоке эстриол быстро связывается в печени и затем экскретируется с мочой, период полужизни составляет ~20 минут. Так как нормальная выработка эстриола зависит от целостности фетоплацентарной циркуляции и метаболизма плода, уровень эстриола в материнском кровотоке используется для мониторинга развития плода во время беременности, особенно в третьем триместре.

DHEA (дегидроэпиандростерон) вырабатывается в коре надпочечников плода, и преобразуется в эстриол в плаценте. Ненормально низкий уровень эстриола у беременной женщины может указывать на проблемы развития плода. Уровень эстриола у женщин значительно не изменяется после менопаузы, и незначительно отличается от уровня эстриола у мужчин.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Общий эстриол (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с эстриолом, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к эстриолу, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты промывкой. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию общего эстриола в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации общего эстриола в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты свободного эстриола STD1 кат. № REFDCЕ002/1907-0 STD2 кат. № REFDCЕ002/1908-0 STD3 кат. № REFDCЕ002/1909-0 STD4 кат. № REFDCЕ002/1910-0	4х (1 флакон = 1 мл)
2. Инкубационный буфер	1 1 флакон = 30 мл

Фосфатный буфер 50 mM pH 7.4; BSA 1 г/л кат. № REF DCE001-0	
3. Конъюгат кат. № DCE002/1902-0 Конъюгат эстриол-HRP	1 флакон, 0,4 мл
4. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к эстриолу, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/1903-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
5. Субстрат TMB H2O2-TMB 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... +8°C в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента TMB/ H2O2 с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения свободного эстриола в диапазоне от 2 нг/мл до 200 нг/мл.
- Клиническая значимость определения свободного эстриола может быть снижена, если пациент получает натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S1,S2,S3,S4)

Перед использованием перемешайте на вортексе в течение 2 минут.

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями свободного эстриола:

S1	S2	S3	S4
нг/мл 2	20	80	200

Стабильность: невскрытые стандарты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +4°C .

5.2. Подготовка конъюгата

Приготовьте конъюгат непосредственно перед использованием.

Внесите 10 мкл концентрата конъюгата (реагент 3) в 2.0 мл буфера для инкубации (реагент 2).

Аккуратно перемешивайте в течение 5 минут, на крутящемся миксере.

Стабильность: после разведения в течение 3 часов при комнатной температуре.

5.3. Подготовка образцов

Определение общего эстриола может быть выполнено в плазме или в сыворотке. Если тестирование не проводится в день взятия образцов, то они должны храниться при -20°C.

5.3. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 4 стандартов (S1-S4), две лунки для B0 и по две лунки для каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	B0	Стандарт	Образец	Бланк
буфер для инкубации	20 мкл			
Образцы			20 мкл	
Стандарты S1-S4		20 мкл		
Разведенный конъюгат	200 мкл	200 мкл	200 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.				
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22-28°C в течение 15 минут в темноте.				
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.				

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями свободного эстриола для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать на незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью,

чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь доннышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций.

- Проведите оптимальную кривую через полученные точки (например, 4хпараметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации, в нг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Неделя беременности	Медиана, нг/мл	Диапазон, нг/мл
17°	18.0	(10 - 27)
18°	25.9	(14 - 51)
19°	39.5	(26 - 52)
20°	40.0	(27 - 53)
21°	45.6	(24 - 66)
22°	39.2	(25 - 58)
23°	56.1	(27 - 70)
24°	56.3	(28 - 75)
25°	64.3	(29 - 84)
26°	68	(41 -105)
27°	57.4	(41 - 110)
28°	78.0	(38 -127)
29°	87	(45 - 146)
30°	75	(45 - 160)
31°	88.0	(50 -170)
32°	90.5	(46 - 175)
33°	100	(60 -180)
34°	105.6	(60-190)
35°	114.2	(65 -200)
36°	126.0	(74 - 210)
37°	177.0	(90 -234)
38°	190.0	(101 -288)
39°	190.0	(102 -306)
40°	180.0	(60 -325)
41°	177.5	(95 -280)

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 4.8%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 8.8%.

10.2. Извлечение

Извлечение 20 – 80 – 160 нг/мл добавленного в образцы общего эстриола в среднем составило ($\pm$ SD) $100\% \pm 4\%$ по отношению к исходной концентрации.

10.3. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация общего эстриола, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.05 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Общий эстриол	100%
16 эпи-эстриол	10.5%
15 α ОН-эстриол	7.0%
Эстриол 3 сульфат	2.0%
Эстрадиол	0.1%
17 эпи-эстриол	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Эстриол 3 α глюкуронат	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Estriol 16 α глюкуронат	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Эстрон	$< 1 \times 10^{-4}\%$

10.5. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra свободный эстриол (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения свободного эстриола. Образцы сывороток 50 женщин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.958x + 0.05$$

$$r = 0.96 (r^2 = 0.92)$$

10.6. Хук-эффект

При тестировании данным методом определения общего эстриола, основанным на конкурентном ИФА, хук-эффект не был обнаружен для концентраций до 400 нг/мл.

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

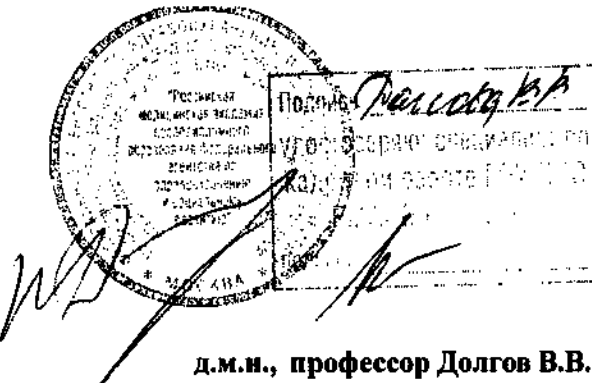
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»


д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2010г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для измерения уровня эстрадиола в слюне ESTRADIOL SALIVA

- 4 Иммуноферментный набор для прямого количественного определения эстрадиола в слюне.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения эстрадиола в слюне.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Эстрадиол (17 β -эстрадиол) является половым гормоном. Это основной человеческий эстроген. Эстрадиол не только оказывает важное воздействие на репродуктивную и половую функции, но также влияет на другие органы, включая структуру кости.

У женщин в репродуктивном возрасте большая часть эстрадиола продуцируется яичниками, меньшие количества эстрадиола также продуцируются корой надпочечников. У мужчин эстрадиол продуцируют тестисы.

Во время беременности уровень эстрогенов, в том числе и эстрадиола, монотонно повышается с увеличением срока беременности. Это происходит за счет плацентарной продукции эстрадиола.

У взрослых женщин в менопаузе продукция эстрадиола стимулируется лютеинизирующим гормоном (ЛГ, LH) и фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ, FSH) на протяжении менструального цикла.

У взрослых женщин уровень эстрадиола измеряют для оценки фертильности и при нарушениях менструального цикла, а также для мониторинга фолликулярного созревания во время индукции овуляции.

У женщин эстрадиол действует как гормон роста для тканей репродуктивных органов.

Развитие вторичных половых признаков у женщин происходит под действием эстрадиола. Эстрадиол также участвует в мужской фертильности.

Эстрадиол участвует в регуляции костного метаболизма. У женщин после наступления менопаузы ускоряется процесс потери костной массы из-за относительного дефицита эстрогена.

Эстрадиол влияет на продукцию многих белков, включая липопротеины, связывающие белки и белки, ответственные за свертываемость крови.

Показано, что эстрогены обладают нейропротекторной функцией.

Эстрадиол, обладающий разнообразными активностями, вовлечен в развитие различных злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы, рак эндометрия. Кроме того, существуют некоторые доброкачественные эстроген-зависимые гинекологические заболевания, такие как эндометриоз, лейомиома матки, маточное кровотечение.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Эстрадиол (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с эстрадиолом, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к эстрадиолу, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза).

После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты.

Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию эстрадиола в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации эстрадиола в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты эстрадиола STD0 кат. № DCE002/2206-0 STD1 кат. № DCE002/2207-0 STD2 кат. № DCE002/2208-0 STD3 кат. № DCE002/2209-0 STD4 кат. № DCE002/2210-0	5х (1 флакон = 1 мл)
2. Инкубационный буфер кат. №DCE001/2201-0 Фосфатный буфер	1 флакон, 30 мл
3. Конъюгат кат. № DCE002/2202-0 Конъюгат эстрадиол-HRP	1 флакон, 0,4 мл
4. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к эстрадиолу, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/2203-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
5. Субстрат TMB H ₂ O ₂ -TMB 0.25 г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 15 мл
6. Стоп-раствор 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 15 мл
7. Концентрат буфера для промывок, 50х NaCl 9 г/л; Tween 20 1г/л кат. №DCE006-0	1 флакон, 20 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Устройство для сбора слюны

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента TMB/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения эстрадиола в диапазоне от 1 пг/мл до 100 пг/мл.

- Клиническая значимость определения эстрадиола может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0,S1,S2,S3,S4)

Перед использованием перемешайте в течение 5 минут на вортексе.

В наборе поставляются готовые к использованию стандарты со следующими концентрациями 17β-эстрадиола:

S0	S1	S2	S3	S4	
пг/мл	0	1	5	20	100

Стабильность:

Вскрытые стандарты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора при +2 ÷ 8°C.

Преобразование в единицы SI: нг/мл × 3,76 = нмоль/л

5.2. Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона в концентрате буфера для промывок до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в подходящей емкости. Храните при комнатной температуре до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.

5.3. Приготовление конъюгата

Приготовьте конъюгат непосредственно перед использованием.

Внесите 10 мкл раствора конъюгата (реагент 3) в 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 2). Тщательно перемешать. Стабилен 3 часа при комнатной температуре 22÷28°C.

Подготовка образцов

Определение эстрадиола данным методом может быть выполнено в слюне.

Образцы слюны рекомендуется собирать в стеклянные центрифужные пробирки с пластиковыми соломинками, например, пробирки для сбора слюны Diametra Saliva Collection Device.

Не используйте для сбора образцов слюны коммерчески доступные пробирки типа "SALIVETTE". Другие коммерчески доступные пробирки для сбора слюны не тестировали.

5.4.1. Метод и ограничения

Соберите образцы слюны в указанное время.

Если не даны специфические указания, образцы слюны могут быть собраны в любое время, с учетом приведенных ниже замечаний:

- Если сбор слюны предполагается проводить утром, убедитесь что он выполняется перед чисткой зубов.
- Если сбор слюны выполняется в дневное время, то убедитесь, что прошло не менее 1 часа с момента последнего приема пищи или жидкости.
- Очень важно получить хорошие чистые образцы – т.е. не контаминированные пищей, помадой, кровью, или другими посторонними материалами.

5.4.2. Подготовка образцов слюны

Дайте слюне стечь по соломинке в стеклянную центрифужную пробирку

- 1) Центрифугируйте образец в течение 15 минут при 3000 грп
- 2) Заморозьте при – 20°C не менее чем на 1 час.
- 3) Центрифугируйте образец еще раз в течение 15 минут при 3000 грп
- 4) Полученные образцы слюны готовы к использованию.
- 5) Образцы можно хранить при 2- 8°C в течение одной недели или более длительный срок при – 20°C.

5.5. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 56 стандартов (S0-S4) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Внесите в лунки согласно схеме:

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Образцы		100 мкл	

Стандарты S0-S4	100 мкл		
Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 2 часов. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки готовым буфером для промывок, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки еще два раза, общее число промывок три. Полностью удалите жидкость из лунок.			
Субстрат TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями эстрадиола для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаково скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь доньшек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций.

Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4х-параметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в пг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Так как концентрация эстрадиола в слюне имеет циркадный ритм, рекомендуется выполнять сбор образцов в одно и то же время (8 часов утра):

Приведенные ниже значения могут быть использованы как предварительные, до тех пор, пока в лаборатории не будут установлены собственные диапазоны нормальных значений.

ЖЕНЩИНЫ:

Фолликулярная фаза: 1 -20 пг/мл

Пик овуляции: 10 -40 пг/мл

Лютеиновая фаза: 5 -25 пг/мл

Менопауза: < 10 пг/мл

ДЕТИ: < 20 пг/мл

МУЖЧИНЫ: < 20 пг/мл

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 7%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 10.4 %.

10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Эстрадиол	100 %
Эстрон	2 %
Эстриол	0.39%
Тестостерон	0.02 %
Кортизол	< 7x10 ⁻³ %
Прогестерон	< 3x10 ⁻⁴ %
ДГЭА-сульфат	< 1x10 ⁻⁴ %

10.3. Извлечение

Извлечение 50 – 100 – 200 пг/мл эстрадиола, добавленного в образцы, «не содержащие плазмы», составило в среднем ($\pm$ SD) 98% $\pm$ 6% относительно исходной концентрации.

10.4 Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация эстрадиола, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.5 пг/мл при 95 % доверительном интервале.

1

2

1

« » 2010г.

[Handwritten signature]

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для измерения уровня 17α OH PROGESTERONE в слюне.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения 17α ОН прогестерона в образцах слюны.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

17-гидроксипрогестерон (17-ОН прогестерон или 17ОНР) является С-21 стероидным гормоном, продуцируемым в надпочечниках и гонадах, в процессе синтеза глюкокортикоидов и половых стероидов sex steroids. Он вырабатывается из прогестерона с при участии фермента 17-гидроксилазы, P450c17, или из 17-гидроксипрегнеполон при участии 3β-гидроксистероид дегидрогеназы /Δ5-4 изомеразы.

У 17α -ОНР нет определенной физиологической роли, кроме того, что он является молекулой-предшественником.

Уровень 17α -ОНР в сыворотке зависит от возраста, максимальные уровни наблюдаются в эмбриональный период и непосредственно после рождения. В течение первой недели жизни уровень 17α -ОНР в сыворотке падает в ~50 раз по сравнению с концентрацией в пуповинной крови. Небольшое неустойчивое повышение наблюдается у мальчиков через 30-60 дней после рождения. Уровни у детей обоих полов остаются на постоянном низком уровне, а затем в пубертатный период постепенно нарастают, достигая взрослых уровней, ~100 нг/дл (~3.03 нмоль/л). Как и для кортизола, в норме наблюдаются АСТН-зависимые суточные колебания сывороточного уровня 17α -ОНР, с пиком в утреннее время и минимальной концентрацией ночью.

Кроме того, продукция 17α -ОНР повышается во время лютеиновой фазы менструального цикла.

17- гидроксипрогестерон является прогестином, во время беременности его уровень повышается в третьем триместре, в основном из-за продукции надпочечниками плода.

Нормальные уровни у детей составляют 3-90 нг/дл у детей, у женщин 15-70 нг/дл перед овуляцией и 35-290 нг/дл в лютеиновой фазе.

Измерение уровня 17- гидроксипрогестерона может быть использовано при обследовании пациентов с подозрением на врожденную гиперплазию надпочечников, так как дефицит ферментов 21-гидроксилазы и 11β-гидроксилазы приводит к накоплению 17ОНР. Наоборот, у некоторых пациентов с дефицитом 17α-гидроксилазы наблюдается очень низкий или неопределяемый уровень 17ОНР.

Повышение уровня 17 α -ОНР от базовой линии и/или после стимуляции АСТН также показано при других формах гиперплазии надпочечников.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

17α ОН прогестерон (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с 17α ОН прогестероном, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к 17α ОН прогестерону, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации,

необходимой для развития окрашивания, Энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию 17 α ОН прогестерона в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации 17 α ОН прогестерона в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты 17ОН прогестерона STD0 кат. № DCE002/2306-0 STD1 кат. № DCE002/2307-0 STD2 кат. № DCE002/2308-0 STD3 кат. № DCE002/2309-0 STD4 кат. № DCE002/2310-0 STD5 кат. № DCE002/2311-0	6х (1 флакон = 1 мл)
2. Конъюгат кат. № DCE002/2302-0 Конъюгат 17ОН Progesterone-HRP	1 флакон, 6 мл
3. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к 17 α ОН прогестерону, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/2303-0	1 планшет с ломаемым и стрипами
4. Субстрат ТМВ H ₂ O ₂ -ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE023-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор (1М фосфорная кислота 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 3 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения 17 α ОН прогестерона в диапазоне от 0.2 нг/мл до 19.2 нг/мл.

- Клиническая значимость определения 17αОН прогестерона может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0, S1, S2, S3, S4, S5)

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями 17α ОН прогестерона:

S0	S1	S2	S3	S4	S5	
нг/мл	0	0.2	0.4	1.6	6.4	19.2

Стабильность: до истечения срока годности набора, указанного на этикетке.

После вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при +4°C.

5.2. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 6 стандартов (S0-S5) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Стандарты S0-S5	50 мкл		
Образцы		50 мкл	
Конъюгат	50 мкл	50 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями 17ОН прогестерона для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать на незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Характеристики метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций. Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4хпараметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в нг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

9.1. Воспроизводимость

9.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных образцов в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 5.7%.

9.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных образцов наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 9%.

9.2. Извлечение

Извлечение 1 – 2 – 4 нг/мл 17ОН прогестерона, добавленного в образцы, составило в среднем ($\pm$ SD) 99.7% $\pm$ 3.4% по отношению к исходной концентрации.

9.3. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

17 α ОН прогестерон	100 %
17 α ОН прогненолон	1.3 %
Прогестерон	1.2 %
Кортизол	2×10^{-2} %
Холестерин	8×10^{-4} %

9.4. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация 17ОН прогестерона, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.1 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

9.5. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra 17ОН прогестерон (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения 17ОН прогестерона. Образцы сывороток 14 женщин, 8 детей и 14 мужчин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам.

$$y = 0.857x + 0.06$$

$$r = 0.993 (r^2 = 0.986)$$

10.6. Хук-эффект

При тестировании данным методом определения 17ОН прогестерона, основанным на конкурентном ИФА, хук-эффект не был обнаружен для концентраций до 40.5 нг/мл.

10. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ОШИБОК / РЕКОМЕНДАЦИИ

Нет колориметрической реакции

- контаминация конъюгата и /или субстрата
- ошибка при выполнении протокола метода (например, случайное пипетирование реагентов в неправильной последовательности, или не из тех флаконов, и т.д.)

Слишком низкая реакция (низкие оптические плотности)

- несоответствующий конъюгат (например, не из данного набора)
- слишком короткое время инкубации, низкая температура инкубации

Слишком сильная реакция (низкие оптические плотности)

- несоответствующий конъюгат (например, не из данного набора)
- слишком длинное время инкубации, высокая температура инкубации
- низкое качество воды, используемой для промывок (плохая очистка воды)
- недостаточная промывка (конъюгат не полностью удален из лунок)

Неожиданные резкие отклонения значений

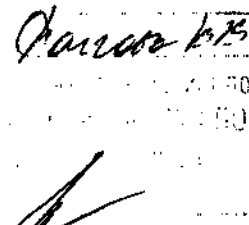
- контаминация пипеток, наконечников или контейнеров
- недостаточная промывка (конъюгат не полностью удален из лунок)
- реагенты и/или стрипы не нагреты до комнатной температуры перед использованием
- микропланшетный вошер некорректно выполняет промывку (рекомендация: прочистить гребенку)
- не постоянные условия инкубаций (время, температура)
- контроли и образцы не вносятся в одной последовательности и с одинаковыми интервалами времени (проверьте порядок пипетирования)
- отклонения, связанные с квалификацией персонала

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (495) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

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



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2010г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для для прямого количественного определения дегидроэпиандростерон сульфата (ДГЭА-С, DHEA-S) в слюне DHEA-S SALIVA.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения дегидроэпиандростерон сульфата (ДГЭА-С, DHEA-S) в слюне.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Дегидроэпиандростерон сульфат (ДГЭА-С, DHEA-S) является естественным стероидным гормоном, секретируется корой надпочечников. DHEA-S образуется при энзиматическом превращении DHEA в надпочечниках и вненадпочечниковых тканях. DHEA-S также продуцируется гонадами, жировой тканью и в мозге. Это наиболее широко распространенный гормон в человеческом организме и он является предшественником всех половых гормонов.

Большая часть DHEA-S продуцируется в ретикулярной зоне надпочечников, что указывает на его роль в иммунном ответе и стрессе. DHEA-S может обладать многими биологическими функциями. Его продукция в мозге дает основания предполагать его действие как нейростероида.

Большая часть DHEA-S в слюне находится в свободной форме, не связанной с белком и попадает в слюну с помощью внутриклеточных механизмов. На уровень DHEA-S в слюне не влияет скорость образования слюны или содержание ферментов в слюне.

Измерение концентрации DHEA-S в сыворотке является полезным маркером синтеза андрогенов надпочечниками. Патологически низкий уровень может наблюдаться при гипофункции надпочечников, тогда как повышенный уровень выявляется при различных состояниях, например, вирилизирующая аденома и карцинома надпочечников, дефицит 21-гидроксилазы и 3 β -гидроксистероид дегидрогеназы, в некоторых случаях гирсутизма. У женщин в синдроме поликистозных яичников уровень DHEA-S обычно нормальный или слегка повышенный. Так как очень незначительное количество DHEA-S продуцируется гонадами, определение уровня DHEA-S может быть использовано для локализации андрогенной причины состояния вирилизации.

Показано, что уровень DHEA-S не подвержен дневным колебаниям.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

DHEA-S (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с DHEA-S, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к DHEA-S, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза).

После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты.

Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию DHEA-S в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации DHEA-S в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты DHEA-S STD0 кат. № DCE002/2406-0 STD1 кат. № DCE002/2407-0 STD2 кат. № DCE002/2408-0 STD3 кат. № DCE002/2409-0 STD4 кат. № DCE002/2410-0	5х (1 флакон = 1 мл)
2. Инкубационный буфер кат. №DCE001 Фосфатный буфер	1 флакон, 30 мл
3. Конъюгат кат. № DCE002/2402-0 Конъюгат DHEA-S-HRP	1 флакон, 0,4 мл
4. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к DHEA-S, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/2403-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
5. Концентрат буфера для промывок, 50х NaCl 9 г/л; Tween 20 1г/л кат. №DCE006-0	1 флакон, 20 мл
6. Субстрат ТМВ H2O2-TMB 0.25 г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 15 мл
7. Стоп-раствор 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 15 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Устройство для сбора слюны

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8С° в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H2O2 с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения DHEA-S в диапазоне от 0.2 нг/мл до 12 нг/мл.
- Клиническая значимость определения DHEA-S может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов

(S0,S1,S2,S3,S4)

Перед использованием перемешайте в течение 5 минут на вортексе.

В наборе поставляются готовые к использованию стандарты со следующими концентрациями DHEA-S:

S0	S1	S2	S3	S4	
нг/мл	0	0.2	1.0	3.0	12

Стабильность:

Вскрытые стандарты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора при $+2 \div 8^{\circ}\text{C}$.

Преобразование в единицы SI: $\text{нг/мл} \times 2,71 = \text{нмоль/л}$

5.2. Приготовление конъюгата

Приготовьте конъюгат непосредственно перед использованием.

Внесите 10 мкл раствора конъюгата (реагент 3) в 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 2). Тщательно перемешать. Стабилен 3 часа при комнатной температуре $22 \div 28^{\circ}\text{C}$.

5.3. Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона в концентрате буфера для промывок до 1 л дистиллированной или деионизированной водой в подходящей емкости. Храните при комнатной температуре до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.

Подготовка образцов

Определение DHEA-S данным методом может быть выполнено в слюне.

Образцы слюны рекомендуется собирать в стеклянные центрифужные пробирки с пластиковыми соломинками, например, пробирки для сбора слюны Diametra Saliva Collection Device.

Не используйте для сбора образцов слюны коммерчески доступные пробирки типа "SALIVETTE".

Другие коммерчески доступные пробирки для сбора слюны не тестировали.

5.4.1. Метод и ограничения

Соберите образцы слюны в указанное время.

Если не даны специфические указания, образцы слюны могут быть собраны в любое время, с учетом приведенных ниже замечаний:

- Если сбор слюны предполагается проводить утром, убедитесь что он выполняется перед чисткой зубов.
- Если сбор слюны выполняется в дневное время, то убедитесь, что прошло не менее 1 часа с момента последнего приема пищи или жидкости.
- Очень важно получить хорошие чистые образцы – т.е. не загрязненные пищей, помадой, кровью, или другими посторонними материалами.

5.4.2. Подготовка образцов слюны

Дайте слюне стечь по соломинке в стеклянную центрифужную пробирку

- 1) Центрифугируйте образец в течение 15 минут при 3000 rpm
- 2) Заморозьте при -20°C не менее чем на 1 час.
- 3) Центрифугируйте образец еще раз в течение 15 минут при 3000 rpm
- 4) Полученные образцы слюны готовы к использованию.
- 5) Образцы можно хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение одной недели или более длительный срок при -20°C .

5.5. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 56 стандартов (S0-S4) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Внесите в лунки согласно схеме:

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Образцы		50 мкл	
Стандарты S0-S4	50 мкл		
Разведенный конъюгат	150 мкл	50 мкл	

Инкубируйте при 37°C в течение 15 минут. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки готовым буфером для промывок, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки еще два раза, общее число промывок три. Полностью удаляйте жидкость из лунок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями DHEA-S для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций. Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4х-параметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в нг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Так как концентрация DHEA-S в слюне имеет циркадный ритм, рекомендуется выполнять сбор образцов в одно и то же время (8 часов утра):

Приведенные ниже значения могут быть использованы как предварительные, до тех пор, пока в лаборатории не будут установлены собственные диапазоны нормальных значений.

ЖЕНЩИНЫ: 0.2 – 2.5 нг/мл

МУЖЧИНЫ: 0.2 – 2.7 нг/мл

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 4.8%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 8.9 %.

10.2. Извлечение

Извлечение 1.25 – 2.5 – 5.0 нг/мл DHEA-S, добавленного в образцы, составило в среднем ($\pm$ SD) 102.7% $\pm$ 4.6% относительно исходной концентрации.

10.3 Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация DHEA-S, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.045 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

DHEA-S	100%
DHEA	65.0%
Андростерон	48 %
Андростендион	20 %
Этиоколанон-S-Na	0.2 %
5-Андростендион	0.01 %
Тестостерон	0.01 %
Прогестерон	0.01 %
17ОН-прогестерон	0.01 %
Эстрон	0.01 %
Кортизол	0.001 %
Холестерин	0.001 %

10.5. Хук-эффект

При анализе данным методом DHEA-S ELISA, основанным на конкурентном иммуноферментном анализе, Хук-эффект не наблюдался до концентрации DHEA-S 40 мкг/мл

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

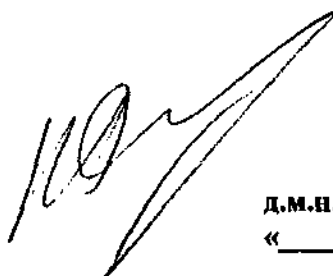
Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

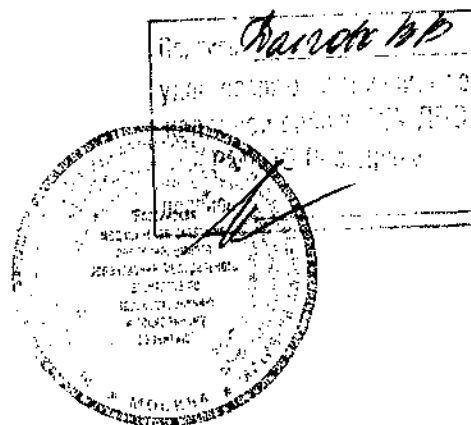
119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (495) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

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



д.м.н., профессор Долгов В.В.
« » 2010г.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для прямого иммуноферментного определения циркулирующих иммунных комплексов, содержащих IgM (IgM-CIC) в сыворотке или плазме IgM-CIC

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения циркулирующих иммунных комплексов, содержащих IgM (IgM-CIC) в человеческой сыворотке и плазме.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

C3-содержащие иммунные комплексы (CIC) на первом этапе фиксируются анти-C3 антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета.

Затем, для количественной оценки комплексов IgM-CIC используют специфические анти-IgM антитела, конъюгированные с пероксидазой и TMB в качестве ферментного субстрата.

Количество продукта, образовавшегося в результате ферментной реакции, измеренное считыванием абсорбции в лунках при длине волны 450 нм, пропорционально уровню IgM-CIC комплексов, связавшихся с твердой фазой на первом этапе анализа.

2. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

2.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
Инкубационный буфер, кат. № DCE014-0 100 ммоль боратный буфер, pH 7.4, 10 г/л BSA	1 флакон, 27 мл
Конъюгат, кат. № DCE002/3402-0 Конъюгат анти-IgM антител с пероксидазой.	1 флакон, 0.75 мл
Буфер для разведения конъюгата, кат. № DCE015-0 100 ммоль боратный буфер, pH 7.4, 10 г/л BSA	1 флакон, 25 мл
Субстрат TMB, кат. № DCE004-0 H ₂ O ₂ -TMB 0.25г/л (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
Стоп-раствор, кат. № DCE005-0 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
96-луночный микропланшет, покрытый анти-C3 (Fab') ₂ , кат. № DCE002/3403-0	1 планшет с ломаемыми стрипами

Замечания

- Все реагенты и микропланшет должны храниться при 2+8°C в темноте и должны быть использованы до окончания срока годности, указанного на упаковке.
- Открывайте пакет с микропланшетом только после того, как он достигнет комнатной температуры, и доставляйте только то количество стрипов, которое необходимо для текущей постановки.
- Неиспользованные стрипы поместите в оригинальный пакет и тщательно его закройте.

2.3 Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

0.9% раствор NaCl

2.4 Дополнительные материалы и оборудование

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU (приблизительно на 5 мл);

Микропипетки, многоканальные пипетки переменного объема или степеры; инкубатор на 37°C;

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с возможностью считывания при длине волны 450 нм.

2.5 Приготовление реагентов

Разведение конъюгата

Для тестирования каждые 16 лунок разведите 100 мкл конъюгата (реагент 2) в 2.0 мл буфера для разведения конъюгата (реагент 3).

Тщательно перемешайте, не допускайте образования пены. Разведенный конъюгат стабилен в течение 3 часов при 18-25°C.

3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный метод может быть использован для анализа образцов сыворотки или плазмы. Если образцы не тестируются сразу после сбора, то они должны храниться при -20°C. Не допускайте повторного замораживания/оттаивания образцов.

4. КОНТРОЛИ

Подходящий параметр для сравнения концентрации CIC в настоящее время отсутствует.

В общем случае для сравнения рекомендуется использовать концентрацию комплексов, содержащих IgG,

который может связываться с комплементом, образуя CIC.

Однако существует несколько ограничений использования IgG-содержащих комплексов для оценки уровня CIC:

- IgG-комплексы не стабильны;
- Продукты температурной агрегации могут не воспроизводиться.

В связи с этими ограничениями предполагается, что наиболее подходящим контролем являются образцы, полученные у популяции здоровых доноров.

Скринингового обследования 50-80 людей достаточно для определения диапазона нормальных значений. Вариации между постановками могут быть исключены включением в каждую постановку 6-10 контрольных образцов, в дублях.

4.1 Предупреждения

- Контрольные сыворотки могут храниться при -20°C в течение нескольких месяцев.
- Образцы должны быть алиquotированы (приблизительно по 50 мкл) и не должны подвергаться повторным циклам замораживания/оттаивания.
- Не используйте лиофилизированную сыворотку или пулированную сыворотку в качестве контролей.
- Выполняйте все этапы анализа одинаково для образцов и контролей.

5. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

5.1 Разведение образцов/контролей

Внесите в пробирку:

Сыворотка/плазма	25 мкл
Инкубационный буфер (реагент 1)	500 мкл

Перемешайте на вортексе.

5.2. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из образцов и контролей, и две лунки для бланка.

Реагент	Контроли	Образцы	Бланк
Разведенные образцы		100 мкл	
Контроли	100 мкл		
Инкубационный буфер			100 мкл

Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.

Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки солевым раствором (0,9% NaCl), используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу (2-3 минуты).

Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
----------------------	---------	---------	--

Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки солевым раствором (0,9% NaCl), используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу (2-3 минуты).			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22-28°C в течение 15 минут.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм во всех лунках (в течение 30 минут после внесения стоп-раствора), после выставления ридера на 0 по бланку.			

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1 Расчет результатов

Результаты выражаются как единицы стандартного отклонения (sd), при сравнении со стандартным отклонением контролей (см. 4).

Em - M

$$sd = \frac{Em - M}{SD}$$

где: Em – среднее значение ОП каждого образца,

M – среднее значение ОП контролей,

SD – стандартное отклонение значений ОП контролей.

Результаты, выраженные как sd (единицы стандартного отклонения) должны быть скорректированы на вариации между постановками, по формуле, приведенной ниже:

$$(sd)d = \frac{sd \times Md}{M}$$

Где: Md – среднее значение ОП всех включенных контролей.

6.2 Интерпретация

Отрицательные результаты: значения менее 2.0 (sd)d считаются отрицательными при определении значимого уровня СИС.

Положительные результаты: значения равные или выше 2.0 (sd)d считаются положительными при определении значимого уровня СИС.

7. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

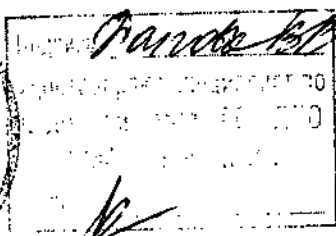
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

 
Д.М.Н., профессор Долгов В.В.
«___» _____ 2010г.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для прямого иммуноферментного определения циркулирующих иммунных комплексов, содержащих IgG (IgG-CIC) в сыворотке или плазме IgG-CIC.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения циркулирующих иммунных комплексов, содержащих IgG (IgG-CIC) в человеческой сыворотке и плазме.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

C3-содержащие иммунные комплексы (CIC) на первом этапе фиксируются анти-C3 антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. Затем, для количественной оценки комплексов IgG-CIC используют специфические анти-IgG антитела, конъюгированные с пероксидазой и TMB в качестве ферментного субстрата. Количество продукта, образовавшегося в результате ферментной реакции, измеренное считыванием абсорбции в лунках при длине волны 450 нм, пропорционально уровню IgG -CIC комплексов, связавшихся с твердой фазой на первом этапе анализа.

2. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

2.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор
	96 тестов
Инкубационный буфер, кат. № DCE014-0 100 ммоль боратный буфер, pH 7.4, 10 г/л BSA	1 флакон, 27 мл
Конъюгат, кат. № DCE002/3302-0 Конъюгат анти-IgG антител с пероксидазой.	1 флакон, 0.75 мл
Буфер для разведения конъюгата, кат. № DCE015-0 100 ммоль боратный буфер, pH 7.4, 10 г/л BSA	1 флакон, 25 мл
Субстрат TMB, кат. № DCE004-0 H2O2-TMB 0.25г/л (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
Стоп-раствор, кат. № DCE005-0 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
96-луночный микропланшет, покрытый анти-C3 (Fab') ₂ , кат. № DCE002/3303-0	1 планшет с ломаемыми стрипами

Замечания

- Все реагенты и микропланшет должны храниться при 2÷8°C в темноте и должны быть использованы до окончания срока годности, указанного на упаковке.
- Открывайте пакет с микропланшетом только после того, как он достигнет комнатной температуры, и доставайте только то количество стрипов, которое необходимо для текущей постановки.
- Неиспользованные стрипы поместите в оригинальный пакет и тщательно его закройте.

2.3 Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

0.9% раствор NaCl

2.4. Дополнительные материалы и оборудование

Стеклянные или пластиковые пробирки (приблизительно на 5 мл);

Микропипетки, многоканальные пипетки переменного объема или степеры; инкубатор на 37°C;

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с возможностью считывания при длине волны 450 нм.

2.5 Приготовление реагентов

Разведение конъюгата

Для тестирования каждые 16 лунок разведите 100 мкл конъюгата (реагент 2) в 2.0 мл буфера для разведения конъюгата (реагент 3).

Тщательно перемешайте, не допускайте образования пены. Разведенный конъюгат стабилен в течение 3 часов при 18-25°C.

3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный метод может быть использован для анализа образцов сыворотки или плазмы. Если образцы не тестируются сразу после сбора, то они должны храниться при -20°C. Не допускайте повторного замораживания/оттаивания образцов.

4. КОНТРОЛИ

Подходящий параметр для сравнения концентрации CIC в настоящее время отсутствует.

В общем случае для сравнения рекомендуется использовать концентрацию комплексов, содержащих IgG, который может связываться с комплементом, образуя CIC.

Однако существует несколько ограничений использования IgG-содержащих комплексов для оценки уровня CIC:

- IgG-комплексы не стабильны;
- Продукты температурной агрегации могут не воспроизводиться.

В связи с этими ограничениями предполагается, что наиболее подходящим контролем являются образцы, полученные у популяции здоровых доноров.

Скринингового обследования 50-80 людей достаточно для определения диапазона нормальных значений.

Вариации между постановками могут быть исключены включением в каждую постановку 6-10 контрольных образцов, в дублях.

4.1 Предупреждения

- Контрольные сыворотки могут храниться при -20°C в течение нескольких месяцев.
- Образцы должны быть аликвотированы (приблизительно по 50 мкл) и не должны подвергаться повторным циклам замораживания/оттаивания.
- Не используйте лиофилизированную сыворотку или пулированную сыворотку в качестве контролей.
- Выполняйте все этапы анализа одинаково для образцов и контролей.

5. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

5.1 Разведение образцов/контролей

Внесите в пробирку:

Сыворотка/плазма	25 мкл
Инкубационный буфер (реагент 1)	500 мкл

Перемешайте на вортексе.

5.2. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из образцов и контролей, и две лунки для бланка.

Реагент	Контроли	Образцы	Бланк
Разведенные образцы		100 мкл	
Контроли	100 мкл		
Инкубационный буфер			100 мкл

Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.

Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки солевым раствором (0,9% NaCl), используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу (2-3 минуты).

Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
----------------------	---------	---------	--

Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.

Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки солевым раствором (0,9% NaCl), используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу (2-3 минуты).

Субстрат
ТМВ

100 мкл

100 мкл

100 мкл

Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут.

Стоп-
раствор

100 мкл

100 мкл

100 мкл

Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм во всех лунках (в течение 30 минут после внесения стоп-раствора), после выставления ридера на 0 по бланку.

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1 Расчет результатов

Результаты выражаются как единицы стандартного отклонения (sd), при сравнении со стандартным отклонением контролей (см. 4).

$E_m - M$

$sd = \frac{E_m - M}{SD}$

SD

где: E_m – среднее значение ОП каждого образца,

M – среднее значение ОП контролей,

SD – стандартное отклонение значений ОП контролей.

Результаты, выраженные как sd (единицы стандартного отклонения) должны быть скорректированы на вариации между постановками, по формуле, приведенной ниже:

M_d

$(sd)_d = sd \times \frac{M_d}{M}$

M

Где: M_d – среднее значение ОП всех включенных контролей.

6.2 Интерпретация

Отрицательные результаты: значения менее 2.0 $(sd)_d$ считаются отрицательными при определении значимого уровня СИ.

Положительные результаты: значения равные или выше 2.0 $(sd)_d$ считаются положительными при определении значимого уровня СИ.

7. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

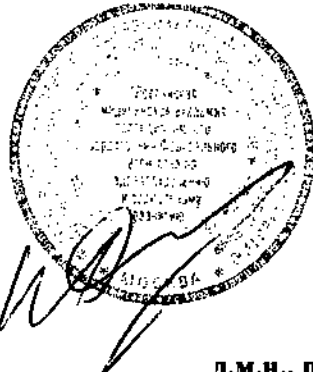
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»


д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2010г.

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для прямого иммуноферментного определения циркулирующих иммунных комплексов, содержащих IgA (IgA-CIC) в сыворотке или плазме.

IgA-CIC

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения циркулирующих иммунных комплексов, содержащих IgA (IgA-CIC) в человеческой сыворотке и плазме.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

СЗ-содержащие иммунные комплексы (CIC) на первом этапе фиксируются анти-СЗ антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета.

Затем, для количественной оценки комплексов IgA-CIC используют специфические анти-IgA антитела, конъюгированные с пероксидазой и ТМВ в качестве ферментного субстрата.

Количество продукта, образовавшегося в результате ферментной реакции, измеренное считыванием абсорбции в лунках при длине волны 450 нм, пропорционально уровню IgA-CIC комплексов, связавшихся с твердой фазой на первом этапе анализа.

2. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

2.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
Инкубационный буфер, кат. № DCE014-0 100 ммоль боратный буфер, pH 7.4, 10 г/л BSA	1 флакон, 27 мл
Конъюгат, кат. № DCE002/3102-0 Конъюгат анти-IgA антител с пероксидазой.	1 флакон, 0.75 мл
Буфер для разведения конъюгата, кат. № DCE015-0 100 ммоль боратный буфер, pH 7.4, 10 г/л BSA	1 флакон, 25 мл
Субстрат ТМВ, кат. № DCE004-0 H ₂ O ₂ -ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
Стоп-раствор, кат. № DCE005-0 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей)	1 флакон, 12 мл
96-луночный микропланшет, покрытый анти-СЗ (Fab') ₂ , кат. № DCE002/3103-0	1 планшет с ломаемыми стрипами

Замечание

- Все реагенты и микропланшет должны храниться при 2÷8°C в темноте и должны быть использованы до окончания срока годности, указанного на упаковке.
- Открывайте пакет с микропланшетом только после того, как он достигнет комнатной температуры, и доставайте только то количество стрипов, которое необходимо для текущей постановки.
- Неиспользованные стрипы поместите в оригинальный пакет и тщательно его закройте.

2.2 Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

0.9% раствор NaCl

2.3. Дополнительные материалы и оборудование

Стеклянные или пластиковые пробирки (приблизительно на 5 мл);

Микропипетки, многоканальные пипетки переменного объема или степперы; инкубатор на 37°C;

Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с возможностью считывания при длине волны 450 нм.

2.4 Приготовление реагентов

Разведение конъюгата

Для тестирования каждые 16 лунок разведите 100 мкл конъюгата (реагент 2) в 2.0 мл буфера для разведения конъюгата (реагент 3).

Тщательно перемешайте, не допускайте образования пены. Разведенный конъюгат стабилен в течение 3 часов при 18-25°C.

3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный метод может быть использован для анализа образцов сыворотки или плазмы. Если образцы не тестируются сразу после сбора, то они должны храниться при -20°C. Не допускайте повторного замораживания/оттаивания образцов.

4. КОНТРОЛИ

Подходящий параметр для сравнения концентрации CIC в настоящее время отсутствует.

В общем случае для сравнения рекомендуется использовать концентрацию комплексов, содержащих IgG, который может связываться с комплементом, образуя CIC.

Однако существует несколько ограничений использования IgG-содержащих комплексов для оценки уровня CIC:

- IgG-комплексы не стабильны;
- Продукты температурной агрегации могут не воспроизводиться.

В связи с этими ограничениями предполагается, что наиболее подходящим контролем являются образцы, полученные у популяции здоровых доноров.

Скринингового обследования 50-80 людей достаточно для определения диапазона нормальных значений. Вариации между постановками могут быть исключены включением в каждую постановку 6-10 контрольных образцов, в дублях.

4.1 Предупреждения

- Контрольные сыворотки могут храниться при -20°C в течение нескольких месяцев.
- Образцы должны быть аликвотированы (приблизительно по 50 мкл) и не должны подвергаться повторным циклам замораживания/оттаивания.
- Не используйте лиофилизированную сыворотку или пулированную сыворотку в качестве контролей.
- Выполняйте все этапы анализа одинаково для образцов и контролей.

5. ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

5.1 Разведение образцов/контролей

Внесите в пробирку:

Сыворотка/плазма	25 мкл
Инкубационный буфер (реагент 1)	500 мкл

Перемешайте на вортексе.

5.2. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из образцов и контролей, и две лунки для бланка.

Реагент	Контроли	Образцы	Бланк
Разведенные образцы		100 мкл	
Контроли	100 мкл		
Инкубационный буфер			100 мкл

Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.

Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки солевым раствором (0,9% NaCl), используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу (2-3 минуты).

Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
----------------------	---------	---------	--

Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.

Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки солевым раствором (0,9% NaCl), используя по 0.3 мл на лунку на один цикл промывки. Полностью удалите жидкость из

лунок после промывки, перевернув микропланшет на чистую фильтровальную бумагу (2-3 минуты).			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (Е) при длине волны 450 нм во всех лунках (в течение 30 минут после внесения стоп-раствора), после выставления ридера на 0 по бланку.			

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1 Расчет результатов

Результаты выражаются как единицы стандартного отклонения (sd), при сравнении со стандартным отклонением контролей (см. 4).

$E_m - M$

$sd = \frac{E_m - M}{SD}$

SD

где: E_m – среднее значение ОП каждого образца,

M – среднее значение ОП контролей,

SD – стандартное отклонение значений ОП контролей.

Результаты, выраженные как sd (единицы стандартного отклонения) должны быть скорректированы на вариации между постановками, по формуле, приведенной ниже:

M_d

$(sd)_d = sd \times \frac{M_d}{M}$

M

Где: M_d – среднее значение ОП всех включенных контролей.

6.2 Интерпретация

Отрицательные результаты: значения менее 2.0 $(sd)_d$ считаются отрицательными при определении значимого уровня CIC.

Положительные результаты: значения равные или выше 2.0 $(sd)_d$ считаются положительными при определении значимого уровня CIC.

7. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

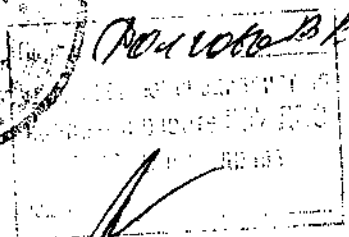
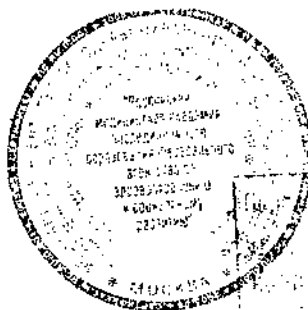
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2010г

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ОАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ

Иммуноферментный колориметрический метод количественного определения функциональной активности комплемента FUNCTIONALITY TEST OF COMPLEMENT (CH 50)

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на иммуноферментном методе колориметрическом методе и предназначен для количественного определения функциональной активности комплемента.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Основное использование CH50 в практике аллерголога-иммунолога – для скрининга дефицита системы комплемента, ассоциированного с иммунодефицитом (первичным или дефицитом терминальных компонентов комплемента). Отсутствие или значительное снижение отдельных компонентов комплемента может приводить к развитию инфекций, менингококкового менингита или сепсиса.

Снижение CH50 в такой ситуации обеспечивает количественную и функциональную активность отдельных компонентов комплемента.

Снижение CH50 наблюдается при дефиците или повышенном потреблении отдельных компонентов комплемента.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Комплекс β -галактозидаза/анти- β -галактозидаза растворяется в сыворотке в присутствии молекул C3b. Образование больших количеств C3b, необходимых для растворения, опосредовано альтернативным путем активации комплемента, и усиливается под действием активности C3-конвертазы классического пути.

Количество диссоциировавшего комплекса β -галактозидазы, детектируемое по энзиматической активности в конце реакции, количественно отражает способность сыворотки образовывать молекулы C3b.

В качестве субстрата используется О-нитрофенилгалактопиранозид (o-NPG), оптическую плотность в лунках измеряют при длине волны 420 нм (или 405 нм).

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Референсная сыворотка, лиофилизированная, кат. № DCE030/4030-0	1 флакон
2. Инкубационный буфер, фосфатный буфер, 50 мМ, pH 7.35 кат. № DCE024-0	1 флакон, 12 мл
3. Иммунокомплекс, β -галактозидаза/анти- β -галактозидаза, кат. № DCE025-0	1 флакон, 6 мл
4. 96-луночный микропланшет, кат. № DMZ001	1 планшет с ломаемыми стрипами
5. Субстрат ONPG, фосфатный буфер 15 мМ pH 7.0 o-NPG 2.3 мМ (избегайте контактов с кожей), кат. № DCE026-0	1 флакон, 15 мл

6. Этанол, кат. № DCE027-0	1 флакон, 1 мл
6. Стоп-раствор, карбонат натрия 16 % (избегайте контактов с кожей), кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

Контроль низкого уровня, кат. № DCE029/4029-0

Контроль высокого уровня, кат. № DCE031/4031-0

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер), с возможностью измерений при длине волны 420 нм или 405 нм

Инкубатор 37°C

Микроцентрифуга (12.000 rpm)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8°C в темноте.

Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием.

Используйте для анализа только образцы сыворотки (не анализируйте образцы плазмы!).

4. ПРОЦЕДУРА

4.1. Приготовление иммунокомплекса

Используйте реагент без какого-либо разведения.

Перед использованием тщательно перемешайте иммунокомплекс на вортексе.

Стабилен 3 месяца при 2÷8°C.

4.2. Приготовление субстрата ONPG

Внесите 10 мл дистиллированной воды во флакон с реагентом. После того, как реагент полностью растворится, внесите 0.5 мл реагента 4 (этанола). Полученный реагент стабилен 2 месяца при 2÷8°C.

4.3. Приготовление референсной сыворотки

Внесите 210 мкл дистиллированной воды во флакон с реагентом. Убедитесь, что реагент полностью растворился, затем медленно перемешайте на вращающемся миксере.

Аликвотируйте референсную сыворотку (и контрольную сыворотку, если используется) по 50 мкл в эппендорфовские пробирки и храните при -20°C. Замороженная референсная сыворотка стабильна в течение 2 месяцев. Точная концентрация CH50 в референсной сыворотке указана на этикетке флакона.

4.4. ПРОЦЕДУРА

Внесите каждый образец сыворотки пациентов, референсную сыворотку и не солюбилизованный контроль в эппендорфовские пробирки:

	Референс ная сыворотка (контроль)	Образ ец	Не солюбилиз и- рованный контроль
Инкубационн ый буфер	100 мкл	100 мкл	150 мкл
Референсная сыворотка (контроль)	50 мкл	---	---
Образец	----	50 мкл	---
Иммунокомпл екс	50 мкл	50 мкл	50 мкл

Тщательно перемешайте и инкубируйте 2 часа при 37°C

Центрифугируйте при 10.000-12.000 rpm в течение 15 минут.

Аккуратно перенесите по 50 мкл полученных супернатантов из каждого эппендорфа в соответствующую лунку микропланшета. Не дотрагивайтесь до сгустка наконечником!

	Бланк	Референс- ная сыворотка (контроль)	Образец	Не солюбилизи- рованный контроль
Инкубаци- онный буфер	50 мкл			
Супернатан- т		50 мкл	50 мкл	50 мкл
ONPG-	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Инкубируйте 15 минут при 37°C

Внесите:

	Бланк	Референсная сыворотка (контроль)	Образец	Не солюбилизи- рованный контроль
Стоп- раствор	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл

Считайте абсорбцию (ОП) при 420 нм (405/420), против бланка.

5. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями СН50 для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать на незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

6. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

6.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

6.2. Интерпретация.

Диагноз не должен основываться только на результатах тестирования данным методом Diametra CH50. Результаты тестирования данным методом должны интерпретироваться в совокупности с результатами других лабораторных анализов, а также килических данных, полученных для пациента.

Данный набор Diametra CH50 предоставляет возможность оценки функциональной активности системы комплемента. Этот тест может выявить патологический уровень комплемента, но не может выявить отклонение в уровне конкретного компонента или компонентов. Отклонения от нормы концентрации определенных компонентов или конкретного компонента, или нарушения альтернативного пути активации комплемента могут существовать несмотря на нормальный уровень CH50. Традиционным методом оценки активности комплемента является метод общего гемолиза. Данный метод Diametra CH 50 основан на способности комплемента растворять иммунокомплекс. При этом в реакции измеряются и классическая активация, и терминальные компоненты комплемента.

Общая активность комплемента обычно отличается от нормальной в случае дефекта какого-либо компонента. Оценка CH50 полезна для скрининга на генетически обусловленные дефициты в системе комплемента и в мониторинге пациентов при болезни иммунных комплексов.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (Em) референсной сыворотки и каждого образца

7.2. Расчет результатов

Результаты могут быть выражены в % от референсной сыворотки или как значение CH50.

Рассчитайте результаты с помощью приведенных ниже формул:

Пример:

Значение CH50 референсной сыворотки = 100

CH50 % от референсной сыворотки = 50

Точное значение CH50 референсной сыворотки указано на этикетке флакона.

Абсорбция референсной сыворотки = 0.350

Абсорбция образца = 1.108

а. $1.108/0.350 \times 100 = 316$ (значение CH50 образца)

б. $1.108/0.350 \times 50 = 158$ % от референсной сыворотки

8. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

% от референсной сыворотки	Значение CH 50	Интерпретация
0 – 50	0 – 100	Отсутствует или низкая
51 – 150	101 – 300	Нормальная
> 151	> 301	Высокая

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

9.1. Корреляция

Случайно выбранные образцы сывороток 60 практически здоровых доноров были протестированы данным методом CH50 Diametra. Для этих образцов значение CH50 в среднем составило 305, значения лежали в диапазоне 121 – 397, при стандартном отклонении 55.

Данный метод DIA.METRA CH50 ELISA сравнивали с другим коммерчески доступным методом. По результатам сравнения была получена линейная регрессия $y = 1.0324x - 0.1164$

10. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

См. инструкцию на английском языке.

Отсутствие колориметрической реакции

- конъюгат не добавлен
- контаминация конъюгата и/или субстрата
- ошибки в выполнении процедуры метода (например, случайное пипетировани реагентов в неправильной последовательности или из неправильного флакона, и т.д.)

- неправильный конъюгат (например, не оригинальный конъюгат из набора)

- короткое время инкубации, низкая температура инкубации

Слишком сильная реакция (очень высокие ОП)

- неправильный конъюгат (например, не оригинальный конъюгат из набора)
- слишком длинное время инкубации, слишком высокая температура инкубации
- недостаточное качество воды для разведения буфера для промывок (низкая степень деионизации)
- недостаточная промывка (конъюгат не полностью удален)

Неожиданные резкие отклонения значений

- контаминация пипеток, наконечников или емкостей, недостаточная промывка (плохо удален конъюгат)

- реагенты и/или стрипы не достигли комнатной температуры перед началом тестирования

- вошер плохо промывает (рекомендация: промойте гребенку вошера)

слишком высокий коэффициент вариаций между сериями

- условия инкубаций не постоянные (время, температура)

- контроли и образцы вносятся не одновременно (не с одинаковыми интервалами) (проверьте схему пипетирования)

- вариации из-за человеческого фактора

1999, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

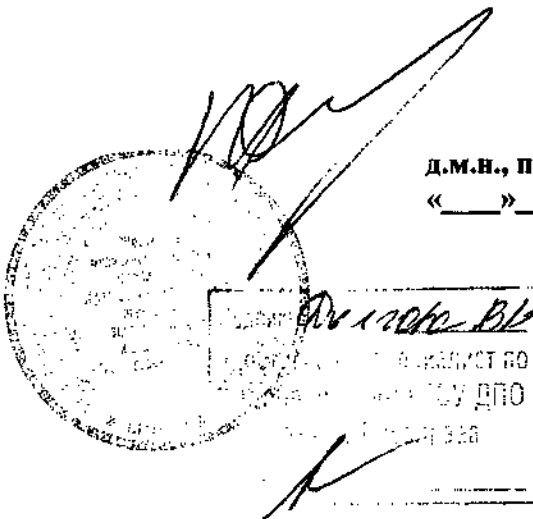
Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

« » 2010г.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для прямого для прямого количественного определения инсулина в сыворотке или плазме INSULIN.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения инсулина в человеческой сыворотке.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Инсулин – это полипептидный гормон, регулирующий метаболизм углеводов. Кроме того, что он является основным эффектором гомеостаза углеводов, он также оказывает воздействие на метаболизм жиров и может влиять на способность печени высвобождать запасы жира.

Инсулин вовлечен в: контроль поглощения глюкозы клетками в мышечной и жировой тканях, усиление репликации ДНК и синтез белков, изменение активности различных ферментов (аллостерический эффект), повышение гликогена, синтез жирных кислот, захват аминокислот, снижение протеинолиза, липолиз, глюконеогенез.

Процесс высвобождения инсулина бета-клетками инсулинзависимый.

У большинства людей уровень глюкозы в крови варьирует от приблизительно 70 мг/дл до, возможно, 110 мг/дл (3.9 - 6.1 ммоль/л), за исключением короткого периода после приема пищи, когда уровень глюкозы в крови временно повышается. Этот гомеостатический эффект является результатом воздействия многих факторов, среди которых гормональная регуляция является наиболее важным.

Существуют многие состояния, характеризующихся патологическим нарушением функций инсулина: сахарный диабет, инсулинома, метаболический синдром, синдром поликистоза яичников.

Сахарный диабет бывает двух типов: тип 1 (аутоиммунное нарушение продукции инсулина бета-клетками поджелудочной железы, приводящее к абсолютному дефициту инсулина), и тип 2 (мультифакторный синдром, с комбинированным влиянием генетической предрасположенности и факторов окружающей среды, наиболее известными из которых являются ожирение, возраст, отсутствие физической активности, в результате чего развивается инсулинорезистентность клеток, требующих инсулин для абсорбции глюкозы. Эта форма диабета строго наследственная). В обоих случаях продукция инсулина должна быть повышена с помощью лекарственных препаратов, либо необходим прием инсулина (орально или внутривенно).

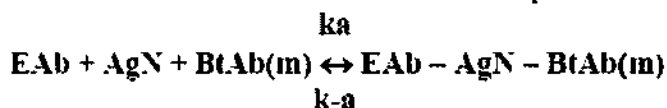
Количественное определение инсулина может быть использовано для определения необходимой дозы.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

В наборе поставляется необходимое для выполнения иммуноферментного анализа количество реагентов, включая высокоаффинные специфические антитела (конъюгированные с ферментом и иммобилизованные), распознающие различные эпитопы, в избытке, и нативный антиген. В данном методе иммобилизация происходит в ходе анализа на поверхности лунок микропланшета при взаимодействии стрептавидина (S. Avidin), сорбированного в лунках, и вносимых биотинилированных моноклональных антител к инсулину (Ab).

При смешивании биотинилированных моноклональных антител, конъюгата антител с ферментом и сыворотки, содержащей нативный антиген (Ag), происходит взаимодействие между нативным антигеном и антителами, без конкуренции или пространственных помех, в результате чего формируется растворимый «сэндвич»-комплекс.

Взаимодействие может быть описано приведенным ниже уравнением:



BtAb(m) = биотинилированные моноклональные

антитела

(избыточное количество)

AgN = нативный антиген (вариабельное количество)

EAb = конъюгат антител с ферментом (избыточное количество)

EAb - AgN - BtAb(m) = «сэндвич»-комплекс антиген-антитела

ka = константа ассоциации

k-a = константа диссоциации

Одновременно с этим процессом образующийся комплекс сорбируется в лунке при высокоаффинном взаимодействии стрептавидина и биотинилированных антител.

Это взаимодействие может быть описано приведенным ниже уравнением:



⇒ Immobilized complex

StreptavidinC.W. = стрептавидин, сорбированный в лунках микропланшета

Immobilized complex = «сэндвич»-комплекс, иммобилизованный в лунках.

После достижения равновесия, фракция, связавшаяся с антителами, отделяется от несвязавшегося антигена декантированием или аспирацией. Активность фермента во фракции, связавшейся с антителами, прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. Количественную оценку активности присутствующего на поверхности лунок по реакции с субстратом и развившемся окрашиванию. Калибровочная кривая строится с использованием стандартов с известными различными концентрациями антигена. Концентрация антигена в образцах определяется по полученной калибровочной кривой.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты инсулина STD0 кат. № DCE002/7606-0 STD1 кат. № DCE002/7607-0 STD2 кат. № DCE002/7608-0 STD3 кат. № DCE002/7609-0 STD4 кат. № DCE002/7610-0 STD5 кат. № DCE002/7611-0	6х (1 флакон = 2 мл)
2. Конъюгат кат. № DCE002/7602-0 Конъюгат анти-инсулин:HRP + мышинные биотинилированные анти- инсулин антитела	1 флакон, 13 мл
3. 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/7603-0	1 планшет с ломаемым и стрипами
4. Субстрат TMB H2O2-TMB 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор (0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей))	1 флакон, 12 мл

кат. № DCE005-0	
6. Концентрат буфера для промывок, 50х	1 флакон, 20 мл
NaCl 9 г/л; Tween-20 1г/л кат. № DCE006/7706-0	

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8°C в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 3 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Компоненты набора должны храниться при 2÷8°C и не должны быть использованы после истечения срока годности.
- Вскрытые реагенты стабильны в течение 60 дней при температуре 2-8°C
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента TMB/ H₂O₂ с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения С-пептида в диапазоне от 0.2 нг/мл до 10.0 нг/мл.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов (S0,S1,S2,S3,S4,S5)

Стандарты, поставляемые в наборе, основаны на человеческой сыворотке и прокалиброваны по референсному стандарту в соответствии с 1-м стандартом ВОЗ IRP 66/304..

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями инсулина (приблизительно):

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
мкМЕ/мл	0		5	25	50	100 300

Растворите каждый стандарт в 2.0 мл дистиллированной или деионизированной воды.

После растворения стандарты стабильны в течение 60 дней при +4°C.

Стандарты содержат консерванты.

5.2. Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона с концентратом буфера для промывок 50х, до 1000 мл, дистиллированной или деионизированной водой, в контейнере, подходящем для хранения. После вскрытия концентрат буфера стабилен до окончания срока годности при +4°C.

5.2. Подготовка образцов

Соблюдайте правила «хорошей лабораторной практики» при работе с материалами, содержащими компоненты крови.

Для получения точных и сравнимых результатов и выработки нормальных значений необходимо получать образцы сыворотки утром натощак.

Кровь должна быть собрана венопункцией в пробирку для забора крови, без добавления каких-либо антикоагулянтов.

Дайте крови свернуться. Центрифугируйте образцы для отделения сыворотки от сгустка.

Образцы могут храниться охлажденными при 2-8°C не дольше 5 дней. Если образцы не могут быть протестированы в указанный период, то они должны быть заморожены и храниться при температуре - 20°C, в течение 30 дней.

Не допускайте повторного замораживания/размораживания.

Для тестирования в дублях требуется 0.050 мл образца.

- Образы сывороток, концентрация инсулина в которых превышает 300 мкМЕ/мл, могут быть разведены (например в 10 раз или более) нулевым стандартом (с концентрацией инсулина 0 мкМЕ/мл) и протестированы еще раз. При расчете исходной концентрации в таких образцах необходимо умножить полученный при тестировании результат на соответствующий коэффициент разведения.

5.3. Процедура

Перед тестированием все реагенты должны достичь комнатной температуры $22\pm 28^{\circ}\text{C}$. Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из стандартов, контролей и образцов. Верните все неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем, тщательно закройте пакет и храните при $2-8^{\circ}\text{C}$.

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Стандарты S0-S5	50 мкл		
Образцы		50 мкл	
Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 часов. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки буфером для промывок, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки два раза, полностью удаляя жидкость из лунок между циклами промывок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре $22\pm 28^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями инсулина для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать

калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок. Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1 Замечание:

ОП калибратора 5 должна быть ≥ 1.3 .

ОП (оптические плотности) некоторых стандартов и образцов могут быть выше 2.0, и, соответственно, не попадать в диапазон измеряемых значений микропланшетного ридера. В этом случае необходимо, для ОП выше 2.0, выполнить считывание при 405 нм, в дополнение к считыванию при 450 нм, и 620 (длина волны сравнения, для вычитания интерференции пластика).

Если используется микропланшетный ридер без возможности считывания при 3х длинах волн, необходимо выполнить следующее:

- считайте ОП в лунках при 450 нм и при 620 нм.
- считайте ОП в лунках еще раз при 405 нм и 620 нм.
- Выберите лунки с ОП при 450 нм выше 2.0
- Выберите соответствующие значения ОП при 405 нм для этих лунок и умножьте эти значения, полученные при 405 нм, на коэффициент преобразования 3.0 (ОП 450/ОП 405 = 3.0), т.е: ОП 450 нм = OD 405 нм x 3.0.

Внимание: Данный коэффициент преобразования 3.0 является приблизительным.

Для получения более точных результатов пользователю необходимо рассчитать коэффициент преобразования, специфический для используемого ридера.

8.2. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (Em) для каждого стандарта и для каждого образца

8.3. Калибровочная кривая – автоматический метод

Для расчета калибровочной кривой рекомендуется использовать 4х-параметрическую регрессию или аппроксимацию гладким сплайном.

8.4. Калибровочная кривая – ручной метод

Для расчета концентрации инсулина в исследуемых образцах используйте калибровочную кривую. Запишите ОП, полученные при считывании. Отложите значения ОП каждого дубля стандартов против соответствующих концентраций инсулина, в мкМЕ/мл, на линейной графической бумаге (не усредняйте значения ОП дублей стандартов перед построением). Проведите оптимальную кривую через полученные точки. Для определения концентрации инсулина в исследуемом образце, найдите среднее значение ОП дублей образца на вертикальной оси Y, затем определите точку пересечения на соответствующем уровне с калибровочной кривой, и считайте соответствующую концентрацию (в мкМЕ/мл) по горизонтальной оси X (значения дублей исследуемых образцов можно усреднить).

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения инсулина в плазме значительно выше, чем в сыворотке; предпочтительно использование образцов сыворотки. Основываясь на клинических данных, накопленных компанией Diametra, в соответствии с опубликованными данными, были получены следующие диапазоны. Эти диапазоны могут быть использованы только как рекомендации.

Дети <12 лет: <10 мкМЕ/мл

Взрослые (здоровые): 0.7 – 9.0 мкМЕ/мл

Диабет (тип II): 0.7 – 25 мкМЕ/мл

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 12 повторов трех сывороток с различными уровнями инсулина в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 6%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли тестированием трех сывороток с различными уровнями инсулина наборами двух лотов. Воспроизводимость между сериями составила 6%.

10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность данного метода определения инсулина с выбранными веществами оценивали добавлением потенциально интерферирующих веществ. Перекрестная реактивность была рассчитана получением отношения дозы интерферирующего вещества к дозе инсулина, необходимой для получения такого же сигнала.

С-пепид	100 %
Проинсулин	0.8%
Инсулин	0%
Глюкагон	0%

10.3. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация С-пептида, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.75 мкМЕ/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra определения инсулина (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения инсулина. Было проанализировано 104 образца сывороток обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.91 x + 2.6$$

$$r = 0.975 (r^2 = 0.95)$$

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

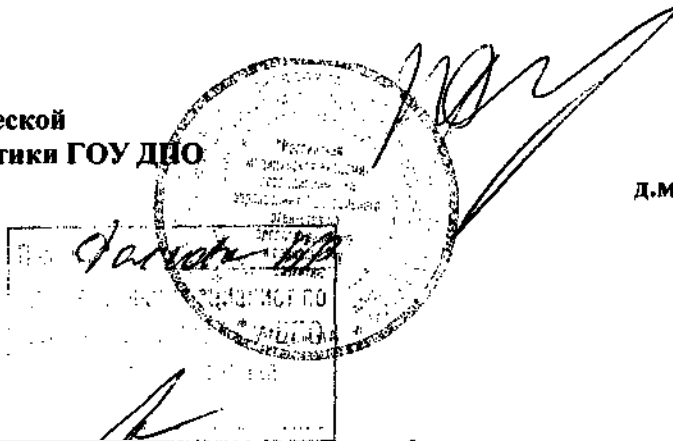
e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2010г

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для прямого количественного определения С-пептида в сыворотке или плазме C-PEPTIDE.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на твердофазном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения С-пептида в человеческой сыворотке и плазме.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

С-пептид – это сокращение от соединительного пептида (connecting peptide), этот пептид состоит из 31 а.к. С-пептид является продуктом расщепления С-терминального участка инсулина, происходящего при процессинге прогормона инсулина до зрелой молекулы инсулина. При секреции из поджелудочной железы в кровоток проинсулин расщепляется с образованием одной молекулы С-пептида на каждую молекулу инсулина. С-пептид не обладает биологической активностью, но считается, что он необходим для поддержания структурной целостности инсулина.

Определение уровней инсулина и С-пептида In-vitro может помочь в дифференциальной диагностике заболевания печени, акромегалии, синдрома Кушинга, наследственная непереносимость глюкозы, инсулинемия, почечная недостаточность, случайное проглатывание оральных гипогликемических препаратов или индуцированная С-пептидом гипогликемия.

При постановке диагноза сахарный диабет у больных часто определяют уровень С-пептида для дискриминации 1го и 2го типа сахарного диабета. Поджелудочная железа пациентов с диабетом 1го типа неспособна продуцировать инсулин и, следовательно, обычно уровень С-пептида у них снижен, тогда как уровень С-пептида у больных с сахарным диабетом 2го типа повышен или в норме. Измерение С-пептида у больных, получающих инсулин, может быть использовано для определения количества инсулина, продуцируемого организмом пациента.

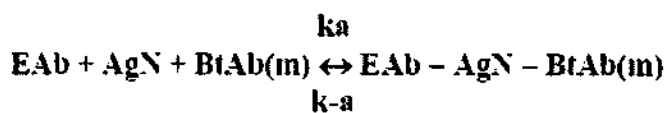
Аналитически методы определения С-пептида могут быть более чувствительными, чем методы определения инсулина. Измерение С-пептида может быть полезным при оценке эндогенной секреции инсулина при различных клинических состояниях. Инсулин и С-пептид секретируются в кровоток в эквивалентных количествах, уровень С-пептида натошак в 5 – 10 раз выше чем уровень инсулина, так как период полувыведения С-пептида значительно дольше. С-пептид не удаляется через печень, он деградирует и удаляется почками, с фракцией, выводимой с мочой в неизмененном виде. Следовательно, уровень С-пептида в моче коррелирует с уровнем С-пептида в сыворотке натошак

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

В наборе поставляется необходимое для выполнения иммуноферментного анализа количество реагентов, включая высокоаффинные специфические антитела (конъюгированные с ферментом и иммобилизованные), распознающие различные эпитопы, в избытке, и нативный антиген. В данном методе иммобилизация происходит в ходе анализа на поверхности лунок микропланшета при взаимодействии стрептавидина (S. Avidin), сорбированного в лунках, и вносимых биотинилированных моноклональных антител к С-пептиду (Ab).

При смешивании биотинилированных моноклональных антител, конъюгата антител с ферментом и сыворотки, содержащей нативный антиген (Ag), происходит взаимодействие между нативным антигеном и антителами, без конкуренции или пространственных помех, в результате чего формируется растворимый «сэндвич»-комплекс.

Взаимодействие может быть описано приведенным ниже уравнением:



BtAb(m) = биотинилированные моноклональные

антитела

(избыточное количество)

AgN = нативный антиген (вариабельное количество)

EAb = конъюгат антител с ферментом (избыточное количество)

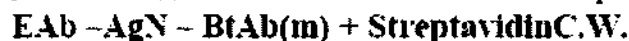
EAb - AgN - BtAb(m) = «сэндвич»-комплекс антиген-антитела

ka = константа ассоциации

k-a = константа диссоциации

Одновременно с этим процессом образующийся комплекс сорбируется в лунке при высокоаффинном взаимодействии стрептавидина и биотинилированных антител.

Это взаимодействие может быть описано приведенным ниже уравнением:



⇒ Immobilized complex

StreptavidinC.W. = стрептавидин, сорбированный в лунках микропланшета

Immobilized complex = «сэндвич»-комплекс, иммобилизованный в лунках.

После достижения равновесия, фракция, связавшаяся с антителами, отделяется от несвязавшегося антигена декантированием или аспирацией. Активность фермента во фракции, связавшейся с антителами, прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. Количественную оценку активности присутствующего на поверхности лунок по реакции с субстратом и развившемуся окрашиванию. Калибровочная кривая строится с использованием стандартов с известными различными концентрациями антигена. Концентрация антигена в образцах определяется по полученной калибровочной кривой.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты С-пептида STD0 кат. № DCE002/7706-0 STD1 кат. № DCE002/7707-0 STD2 кат. № DCE002/7708-0 STD3 кат. № DCE002/7709-0 STD4 кат. № DCE002/7710-0 STD5 кат. № DCE002/7711-0	6х (1 флакон = 2 мл)
2. Конъюгат кат. № DCE002/7702-0 Конъюгат анти-С-пептид:HRP + мышинные биотинилированные анти-С-пептид антитела	1 флакон, 13 мл
3. 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/7703-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
4. Субстрат ТМВ H2O2-ТМВ 0.25г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 12 мл
5. Стоп-раствор (0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 12 мл
6. Концентрат буфера для промывок, 50х NaCl 9 г/л; Tween-20 1г/л кат. № DCE006/7706-0	1 флакон, 20 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Замечания:

Храните все реагенты при $+2... + 8^{\circ}\text{C}$ в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 3 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Компоненты набора должны храниться при $2\div 8^{\circ}\text{C}$ и не должны быть использованы после истечения срока годности.
- Вскрытые реагенты стабильны в течение 60 дней при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента TMB/ H_2O_2 с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения С-пептида в диапазоне от 0.2 нг/мл до 10.0 нг/мл.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов (S0,S1,S2,S3,S4,S5)

Стандарты, поставляемые в наборе, основаны на человеческой сыворотке и прокалиброваны по референсному стандарту в соответствии с 1-м стандартом ВОЗ С-пептида IRR 84/510.

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями С-пептида:

S0	S1	S2	S3	S4	S5	
нг/мл	0	0,2	1,0	2,0	5,0	10,0

Растворите каждый стандарт в 2.0 мл дистиллированной или деионизированной воды.

После растворения стандарты стабильны в течение 7 дней при $2\div 8^{\circ}\text{C}$.

Для хранения в течение более длительного периода стандарты необходимо аликвотировать и хранить замороженными при -20°C .

Не допускайте повторного замораживания/размораживания.

Стандарты содержат консерванты.

5.2. Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона с концентратом буфера для промывок 50х, до 1000 мл, дистиллированной или деионизированной водой, в контейнере, подходящем для хранения.

5.2. Подготовка образцов

Соблюдайте правила «хорошей лабораторной практики» при работе с материалами, содержащими компоненты крови.

Для получения точных и сравнимых результатов и выработки нормальных значений необходимо получать образцы сыворотки утром натощак.

Кровь должна быть собрана венопункцией в пробирку для забора крови, без добавления каких-либо антикоагулянтов.

Дайте крови свернуться. Центрифугируйте образцы для отделения сыворотки от сгустка.

Образцы могут храниться охлажденными при $2-8^{\circ}\text{C}$ не дольше 5 дней. Если образцы не могут быть протестированы в указанный период, то они должны быть заморожены и храниться при температуре -20°C , в течение 30 дней.

Не допускайте повторного замораживания/размораживания.

Для тестирования в дублях требуется 0.050 мл образца.

Образцы сывороток, концентрация С-пептида в которых превышает 10.0 нг/мл, могут быть разведены (например в 10

Раз или более) нулевым стандартом (с концентрацией С-пептида 0 нг/мл) и протестированы еще раз.

При расчете исходной концентрации в таких образцах необходимо умножить полученный при тестировании результат на соответствующий коэффициент разведения.

5.3. Процедура

Перед тестированием все реагенты должны достичь комнатной температуры $22\pm 28^{\circ}\text{C}$. Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из стандартов, контролей и образцов. Верните все неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем, тщательно закройте пакет и храните при $2-8^{\circ}\text{C}$.

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Стандарты S0-S5	50 мкл		
Образцы		50 мкл	
Конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 часов. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки буфером для промывок, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки два раза, полностью удаляя жидкость из лунок между циклами промывок.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре $22\pm 28^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями С-пептида для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаково скоростью,

чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь доньшек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1 Замечание:

ОП калибратора 5 должна быть ≥ 1.0 .

ОП (оптические плотности) некоторых стандартов и образцов могут быть выше 2.0, и, соответственно, не попадать в диапазон измеряемых значений микропланшетного ридера. В этом случае необходимо, для ОП выше 2.0, выполнить считывание при 405 нм (=длина волны плеча пика) в дополнение к считыванию при 450 нм (длина волны пика) и 620 (длина волны сравнения, для вычитания интерференции пластика).

Если используется микропланшетный ридер без возможности считывания при 3х длинах волн, необходимо выполнить следующее:

- считайте ОП в лунках при 450 нм и при 620 нм.
- считайте ОП в лунках еще раз при 405 нм и 620 нм.
- Выберите лунки с ОП при 450 нм выше 2.0
- Выберите соответствующие значения ОП при 405 нм для этих лунок и умножьте эти значения, полученные при 405 нм, на коэффициент преобразования 3.0 ($ОП\ 450/ОП\ 405 = 3.0$), т.е: $ОП\ 450\ нм = OD\ 405\ нм \times 3.0$.

Внимание: Данный коэффициент преобразования 3.0 является приблизительным.

Для получения более точных результатов пользователю необходимо рассчитать коэффициент преобразования, специфический для используемого ридера.

8.2. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.3. Калибровочная кривая – автоматический метод

Для расчета калибровочной кривой рекомендуется использовать 4х-параметрическую регрессию или аппроксимацию гладким сплайном.

8.4. Калибровочная кривая – ручной метод

Для расчета концентрации С-пептида в исследуемых образцах используйте калибровочную кривую. Запишите ОП, полученные при считывании. Отложите значения ОП каждого дубля стандартов против соответствующих концентраций С-пептида, в нг/мл, на линейной графической бумаге (не усредняйте значения ОП дублей стандартов перед построением). Проведите оптимальную кривую через полученные точки. Для определения концентрации С-пептида в исследуемом образце, найдите среднее значение ОП дублей образца на вертикальной оси Y, затем определите точку пересечения на соответствующем уровне с калибровочной кривой, и считайте соответствующую концентрацию (в нг/мл) по горизонтальной оси X (значения дублей исследуемых образцов можно усреднить).

9. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения С-пептида в плазме значительно выше, чем в сыворотке; предпочтительно использование образцов сыворотки. Сравнивайте значения, полученные при тестировании образцов сывороток, полученных утром натощак.

Основываясь на клинических данных, накопленных компанией Diametra, в соответствии с опубликованными данными, были получены следующие диапазоны. Эти диапазоны могут быть использованы только как рекомендации.

Взрослые (норма) 0.7 – 1.9 нг/мл

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

10.1. Воспроизводимость

10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 20 повторов трех различных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила от 5.14 до 8.43%.

10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным (20х) тестированием трех различных сывороток в двух постановках. Воспроизводимость между сериями составила от 4.95 до 9.45%.

10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность данного метода определения С-пептида с выбранными веществами оценивали добавлением потенциально интерферирующих веществ. Перекрестная реактивность была рассчитана получением отношения дозы интерферирующего вещества к дозе С-пептида, необходимой для получения такого же сигнала.

С-пепид	100 %
Проинсулин	1.2%
Инсулин	0%
Глюкагон	0%

10.3. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация С-пептида, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.025 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

10.4. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra определения С-пептида (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения С-пептида. Было проанализировано 124 образца сывороток обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.804 x + 0.208$$

$$r = 0.975 (r^2 = 0.95)$$

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

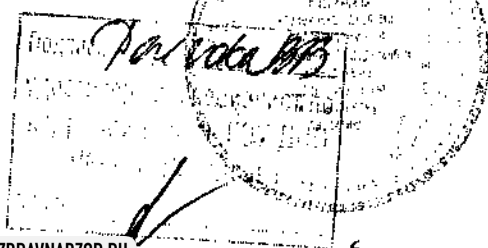
Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » _____ 2010г



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____



ИНСТРУКЦИЯ

По применению иммуноферментного набора для прямого количественного определения IgA в слюне IgA SALIVA.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения IgA в слюне.

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

У человека иммуноглобулин А (IgA) находится преимущественно в виде мономера (85-90%) с молекулярной массой 160 kD. В димерной или полимерной молекуле IgA дополнительно содержится J-цепь. Около 40% IgA находится внутри сосудов.

Около 60 мг/кг веса тела IgA ежедневно синтезируется плазматическими клетками. Время полужизни 5.4 - 5.9 дней.

IgA нейтрализуют вирусные антигены и бактериальные токсины и в агрегированном виде может активировать комплемент через альтернативный путь. IgA – основной иммуноглобулин в биологических секретах. Секреторный IgA находится здесь почти исключительно в виде димера, содержащего секреторный компонент в виде гликопротеина с молекулярной массой 70 kD.

Секреторный IgA выполняет защитную функцию на слизистых оболочках. Плацентарный барьер непроницаем для IgA, следовательно, он отсутствует в фетальной крови. Сывороточные концентрации IgA в сыворотке достигают взрослого уровня только к возрасту 12 лет.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

IgA (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с IgA, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к IgA, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза).

После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (H₂O₂) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, ферментативную реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию IgA в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации IgA в образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

3.1 Реагенты, поставляемые в наборе.

Реагент	Набор 96 тестов
1. Стандарты эстрадиола STD0 кат. № DCE002/7806-0 STD1 кат. № DCE002/7807-0 STD2 кат. № DCE002/7808-0 STD3 кат. № DCE002/7809-0 STD4 кат. № DCE002/7810-0	5х (1 флакон = 1 мл)
2. Инкубационный буфер кат. № DCE001/2201-0	1 флакон, 30 мл

Фосфатный буфер	
3. Конъюгат кат. № DCE002/7802-0 Конъюгат эстрадиол-HRP	1 флакон, 0,4 мл
4. 96-луночный микропланшет, покрытый IgG антителами к эстрадиолу, в алюминиевом пакете. кат. № DCE002/7803-0	1 планшет с ломаемыми стрипами
5. Субстрат ТМВ H2O2-ТМВ 0.25 г/л (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE004-0	1 флакон, 15 мл
6. Стоп-раствор 0.15 моль/л серная кислота (избегайте контактов с кожей) кат. № DCE005-0	1 флакон, 15 мл
7. Концентрат буфера для промывок, 50х NaCl 9 г/л; Tween 20 1г/л кат. № DCE006-0	1 флакон, 20 мл

3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

Устройство для сбора слюны

Замечания:

Храните все реагенты при +2... + 8°C в темноте.

Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.

Вскрытый Микропланшет стабилен до истечения срока годности набора. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не используйте для анализа образцы с сильным гемолизом.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/ H2O2 с металлами или оксидантами.
- Данный метод позволяет проводить измерения эстрадиола в диапазоне от 1 пг/мл до 100 нг/мл.
- Клиническая значимость определения эстрадиола может быть снижена, если пациент получает кортизон или натуральные или синтетические стероиды.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка стандартов (S0,S1,S2,S3,S4)

Перед использованием перемешайте в течение 5 минут на вортексе.

В наборе поставляются готовые к использованию стандарты со следующими концентрациями IgA:

S0	S1	S2	S3	S4	
пг/мл	0	1	5	20	100

Стабильность:

Вскрытые стандарты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора при +2 ÷ 8°C.

Преобразование в единицы SI: нг/мл x 3,76 = нмоль/л

5.2. Приготовление буфера для промывок

- Разведите содержимое флакона в концентратом буфера для промывок до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в подходящей емкости. Храните при комнатной температуре до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.

5.3. Приготовление конъюгата

Приготовьте конъюгат непосредственно перед использованием.

Внесите 10 мкл раствора конъюгата (реагент 3) в 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 2). Тщательно перемешать. Стабилен 3 часа при комнатной температуре 22÷28°C.

Подготовка образцов

Определение эстрадиола данным методом может быть выполнено в слюне.

Образцы слюны рекомендуется собирать в стеклянные центрифужные пробирки с пластиковыми соломинками, например, пробирки для сбора слюны Diametra Saliva Collection Device.

Не используйте для сбора образцов слюны коммерчески доступные пробирки типа "SALIVETTE".

Другие коммерчески доступные пробирки для сбора слюны не тестировали.

5.4.1. Метод и ограничения

Соберите образцы слюны в указанное время.

Если не даны специфические указания, образцы слюны могут быть собраны в любое время, с учетом приведенных ниже замечаний:

- Если сбор слюны предполагается проводить утром, убедитесь что он выполняется перед чисткой зубов.
- Если сбор слюны выполняется в дневное время, то убедитесь, что прошло не менее 1 часа с момента последнего приема пищи или жидкости.
- Очень важно получить хорошие чистые образцы – т.е. не контаминированные пищей, помадой, кровью, или другими посторонними материалами.

5.4.2. Подготовка образцов слюны

Дайте слюне стечь по соломинке в стеклянную центрифужную пробирку

- Центрифугируйте образец в течение 15 минут при 3000 rpm
- Заморозьте при – 20°C не менее чем на 1 час.
- Центрифугируйте образец еще раз в течение 15 минут при 3000 rpm
- Полученные образцы слюны готовы к использованию.
- Образцы можно хранить при 2- 8°C в течение одной недели или более длительный срок при – 20°C.

5.5. Процедура

Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из 56 стандартов (S0-S4) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Внесите в лунки согласно схеме:

Реагент	Стандарт	Образец	Бланк
Образцы		100 мкл	
Стандарты S0-S4	100 мкл		
Разведенный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при 37°C в течение 2 часов. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки готовым буфером для промывок, по 300 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки еще два раза, общее число промывок три. Полностью удалите жидкость из лунок.			
Субстрат TMB	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22÷28°C в течение 15 минут в темноте.			

Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями IgA для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

7.1. Постановка метода.

Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией. Для хорошей воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным и одинаковым для всех лунок.

Время внесения образцов в лунки не должно превышать десять (10) минут, чтобы избежать сдвига во времени реакции. При постановке более одного (1) планшета рекомендуется анализировать калибровочную кривую на каждом микропланшете. Внесение субстратного раствора инициирует реакцию, которая завершается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать какой-либо задержки во времени начала и окончания реакции. Ридер считывает абсорбцию вертикально. Не дотрагивайтесь донышек лунок.

Неполное удаление аспирацией или декантированием промывающей жидкости при промывке может привести к плохой воспроизводимости и ошибочным результатам.

7.2. Интерпретация.

При использовании компьютерного программного обеспечения для обработки результатов тестирования, прописанные концентрации стандартов не должны отличаться от полученных концентраций больше, чем на 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (E_m) для каждого стандарта и для каждого образца

8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (E_m) против соответствующих концентраций. Проведите оптимальную кривую через полученные точки. (например, 4х-параметрическая регрессия).

8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита, в пг/мл, в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

9.1. Воспроизводимость

9.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 16 повторов двух различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила 7%.

9.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила 10.4 %.

9.2. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Эстрадиол	100 %
Эстрон	2 %
Эстриол	0.39%
Тестостерон	0.02 %
Кортизол	$< 7 \times 10^{-3}$ %
Прогестерон	$< 3 \times 10^{-4}$ %
ДГЭА-сульфат	$< 1 \times 10^{-4}$ %

9.3. Извлечение

Извлечение 50 – 100 – 200 пг/мл IgA, добавленного в образцы, «не содержащие плазмы», составило в среднем ($\pm$ SD) 98% $\pm$ 6% относительно исходной концентрации.

9.4 Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация IgA, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.5 пг/мл при 95 % доверительном интервале.

10 УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО БиоХимМак

Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),

9392421, 9395808,

факс (495) 939-09-97.

e-mail: info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрави»

д.м.н., профессор Долгов В.В.