



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации эритропоэтина
в сыворотке (плазме) крови
(*Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ*)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

Уровень эритропоэтина повышается у больных, страдающих апластической анемией, миелодиспластическим синдромом, железодефицитными анемиями (вызванными воздействием цитотоксических агентов типа азидотимидина), врожденными сердечными патологиями, при вторичных полицитемиях (например, гипоксии на больших высотах, хронических обструктивных заболеваниях легких, легочном фиброзе), при эритропоэтин-продуцирующих опухолях (например, гемангиобластомах мозжечка, феохромоцитомах, опухолях почек), во время беременности, при поликистозе почек, после умеренного кровотечения у здорового человека. Снижение уровня эритропоэтина наблюдается у лиц с почечной недостаточностью, лиц, находящихся на гемодиализе, при миеломной болезни, при первичных полицитемиях.

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

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

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

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности поликлональными антителами к эритропоэтину, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта ВОЗ 2nd International Standard for Erythropoietin, Recombinant (88/574), содержащие известные количества эритропоэтина – 0; 2; 10; 50; 100; 200 мМЕ/мл; концентрации эритропоэтина в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием эритропоэтина, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- конъюгат моноклональных антител к эритропоэтину с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,4 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (PPK) – 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

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

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

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации эритропоэтина, предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 10 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация эритропоэтина не превышает 0,5 мМЕ/мл (4 пг/мл).

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

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента

на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

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

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

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

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

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $37 \pm 1^\circ C$ и 400–800 об/мин;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цит-рата натрия.

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

Повторное размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 5 мин при температуре $18-25^\circ C$.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдерживать при температуре 18–25°C в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30–40°C до полного растворения осадка.

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

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

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию.

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

После отбора части содержимого тщательно закупоренные флаконы хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится из концентрата конъюгата и раствора для разведения конъюгата за 5–10 мин до окончания первой инкубации.

Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18–25°C.

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

В соответствии с числом используемых стрипов в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество РРК, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится из концентрата тетраметилбензидина и субстратного буферного раствора за 5–10 мин до окончания второй инкубации.

Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18–25°C в защищенном от света месте.

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

В соответствии с числом используемых стрипов в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наколочки. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

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

7.8. Внести в соответствующие лунки в дуб-лях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

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

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см. п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

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

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

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

По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 7.10.

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

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

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

9.4. Для представления результатов измерения концентрации эритропоэтина в пг/мл значения, полученные в мМЕ/мл, умножают на коэффициент пересчета 8:

1 мМЕ/мл ЭПО соответствует 8 пг/мл ЭПО.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $2\text{--}8^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности (14 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

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

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

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора;
- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора;
- калибровочные образцы, контрольный образец и концентрат конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 18–25°C не более 3 ч;
- промывочный раствор можно хранить при температуре 2–8°C не более 5 сут;
- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре 18–25°C не более 3 ч.

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации эритропоэтина в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя). Набор можно использовать для определения концентрации ЭПО в биологических жидкостях человека и культуральных жидкостях.

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с исследуемыми образцами

При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и в методических указаниях МУ-287-113-00 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998). Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами. Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7 настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиНом 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

3. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;
- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и ТМБ;
- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;
- рабочие поверхности столов, оборудования обрабатывайте 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);
- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и рабочего раствора ТМБ;
- перед отбором ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флаконов с СБР и ТМБ;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.
- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.
- Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.
- Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.
- Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- соотношение оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_2 < ОП_{10} < ОП_{50} < ОП_{100} < ОП_{200}$;
- $ОП_{200} \geq 0,9$ ед. опт. плотн. (о.е.);
- $ОП_0 \leq 0,2$ о.е.;
- вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ЭПО в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

$ОП_0$, $ОП_2$, $ОП_{10}$, $ОП_{50}$, $ОП_{100}$ и $ОП_{200}$ – значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 2, 10, 50, 100 и 200 мМЕ/мл соответственно, измеренное в двухволновом режиме 450 / 620–655 нм (или только с фильтром 450 нм);

5. Расчет результатов анализа

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации ЭПО (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Определить концентрацию ЭПО в контрольном образце и в анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации ЭПО в образце.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

6. Диагностическая значимость

В нормальных физиологических условиях содержание ЭПО невелико; оно увеличивается при гипоксическом состоянии, наблюдаемом при кровопотерях, снижении кислорода во вдыхаемом воздухе, различных формах анемии.

Норма: у мужчин – 5,6–28,9 мМЕ/мл
у женщин – 8,0–30,0 мМЕ/мл

В последние десятилетия клиницисты встретились с необычным видом анемии, возникающей при хронической почечной недостаточности, применении высоких доз цитостатиков и в терминальной стадии злокачественных опухолей, которая не поддавалась традиционным методом лечения (препараты железа, витамин В12, фолиевая кислота). Вместе с тем, количество случаев с этим видом малокровия в настоящее время прогрессивно растет в связи с драматическим увеличением частоты сахарного диабета, одним из главных осложнений которого является хроническая почечная недостаточность, онкологическими заболеваниями и расширением применения высокодозовой химиотерапии для их лечения. Проведенными исследованиями было установлено, что такой вид анемии обусловлен недостатком в организме ЭПО. Этот вид малокровия получил название эритропоэтин-дефицитной анемии. Анемия вследствие недостатка ЭПО наблюдается не только при хронических заболеваниях почек (основное место выработки эритропоэтина), но и при других патологических состояниях.

К ним относятся:

- анемия при хронических воспалительных состояниях;
- анемия при злокачественных образованиях;
- анемия недоношенных новорожденных детей и др.

Особую категорию составляют анемии беременных и послеродовые анемии. Показано, что неадекватно низкая продукция эритропоэтина – это один из наиболее частых патогенетических механизмов развития анемии у беременных. Также известно, что многие отклонения в развитии плода связаны именно с анемией у матери.

Для устранения эритропоэтин-дефицитной анемии необходимо вводить недостающий в организме ЭПО в виде заместительной терапии.

В последнее десятилетие, благодаря клонированию человеческого ЭПО, были созданы коммерческие препараты рекомбинантного человеческого ЭПО (рчЭПО). Несмотря на полную идентичность природному ЭПО, рчЭПО является лекарственным препаратом, обладающим всеми свойствами инородного вещества. Применение рчЭПО сопровождается целый ряд побочных эффектов. Таким образом, при использовании рчЭПО в качестве лекарственного препарата необходимо контролировать уровень ЭПО в крови.

Показания для определения уровня ЭПО в сыворотке крови:

- дифференциальная диагностика анемий,
- дифференциальная диагностика полицитемий,
- мониторинг при использовании рчЭПО в качестве лекарственного препарата.

Уровень эритропоэтина повышается у больных, страдающих:

- апластической анемией,
- миелодиспластическим синдромом,
- железодефицитными анемиями (вызванными воздействием цитотоксических агентов типа азидотимидина),
- врожденными сердечными патологиями,
- при вторичных полицитемиях (например, гипоксии на больших высотах, хронических обструктивных заболеваниях легких, легочном фиброзе),
- при эритропоэтин-продуцирующих опухолях (например, гемангиобластомах мозжечка, феохромоцитомах, опухолях почек),
- во время беременности,
- при поликистозе почек,
- после умеренного кровотечения у здорового человека.

Снижение уровня эритропоэтина наблюдается у лиц:

- с почечной недостаточностью,
- находящихся на гемодиализе,
- при опухолях (миеломной болезни),
- при первичных полицитемиях.

7. Краткая схема проведения ИФА

для набора реагентов

«Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл РРС.

Внести: по 100 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;
по 100 мкл исследуемых образцов в дублях.

Инкубировать: 45 мин, 37°C, 700 об/мин.

Промыть: промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°C, 700 об/мин.

Промыть: промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.

Инкубировать: 15 мин, 18–25°C, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используе- мых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода., мл
2	0,2	1,8	0,1	2,0	4,0	до 100
4	0,4	3,6	0,2	4,0	8,0	до 200
6	0,6	5,4	0,3	6,0	12,0	до 300
8	0,8	7,2	0,4	8,0	16,0	до 400
10	1,0	9,0	0,5	10,0	20,0	до 500
12	1,2	10,8	0,6	12,0	24,0	до 600

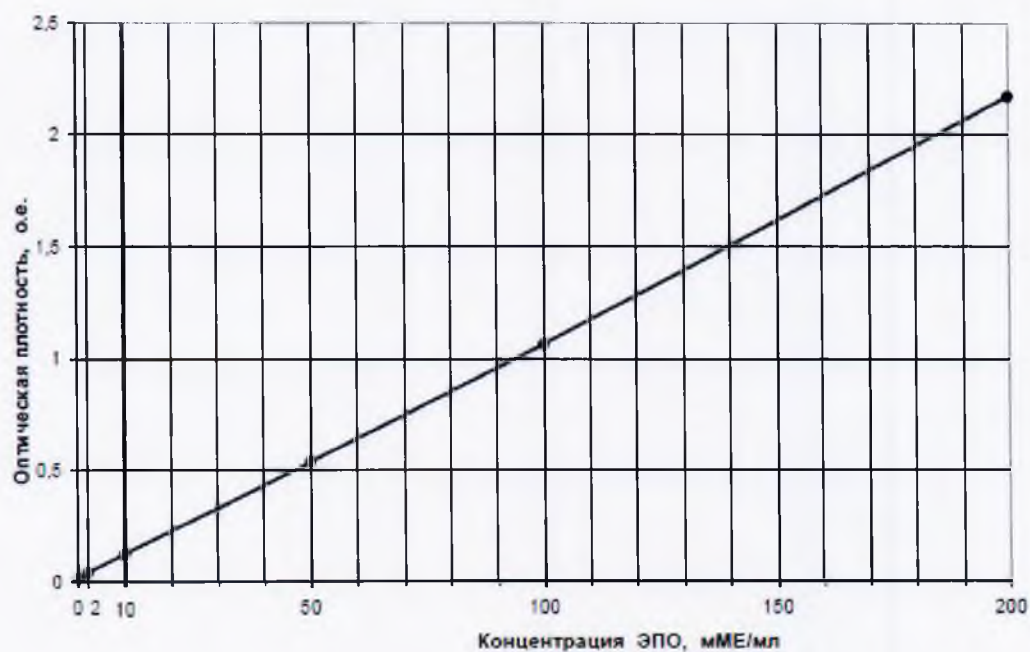


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации ЭПО в калибровочных образцах.

Графические символы

	Изготовитель		Дата изготовления
	Код партии		Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению.		Использовать до....
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Не стерильно		Не допускать воздействия солнечного света

**По вопросам, касающимся качества набора
«Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:**

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-05-97.