



Институт за онкологију и радиологију Србије

Пастерова 14, Београд, Србија
+381 11 2067 100
iors@ncrc.ac.rs www.ncrc.ac.rs


РЕПУБЛИКА СРБИЈА
ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ
Бр. 26-158
21 SEP 2015 20
БЕОГРАД, Пастерова 14

ПРОЦЕДУРА

ОДРЕЂИВАЊА КОНЦЕТРАЦИЈЕ ПОЛНИХ ХОРМОНА (ЕСТРАДИОЛ, ФСХ, ЛХ) ИЗ СЕРУМА ПАЦИЈЕНАТА *ELISA* МЕТОДОМ

Ознака процедуре	П.ЕОЛ.04
Верзија	01
Датум усвајања	21.09.2015.
Аутори процедуре	Др сц Наташа Тодорович Раковић
Носилац процедуре	Др сц мед Мирјана Бранковић Магић
Процедуру одобрио	Проф. др Радан Џодић



 <p>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</p>	Назив процедуре: Процедура одређивање концентрације полних хормона (естрадиол, ФСХ, ЛХ) из серума пацијената <i>ELISA</i> методом		Ознака: П.ЕОЛ.04
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 2 од 6

1. ДЕФИНИЦИЈЕ И СКРАЋЕНИЦЕ

ИОРС= Институт за онкологију и радиологију Србије

ОЕО = Одељење за експерименталну онкологију

ELISA = „*Enzyme-linked immunosorbent assay*”, метода ензимске имунодетекције

ФСХ = фоликуло стимулирајући хормон

ЛХ = лутеинизирајући хормон

В.О.К. = високо образовни кадар - лекари, дипл биолози/молекуларни биолози, дипл биохемичари

2. ПРЕДМЕТ

Ова процедура одређује активности, носиоце активности и документацију за спровођење одређивања полних хормона из серума пацијената.

3. ПОДРУЧЈЕ ПРИМЕНЕ

Подручје примене је Лабораторија за рецепторе и биологију малигне ћелије ОЕО

4. ОДГОВОРНОСТИ

Шеф лабораторије одговоран је за израду плана рада В.О.К. и одговорног техничара и компјутерско бележење и чување резултата.

В.О.К. је одговоран за извођење лабораторијских анализа и уписивање резултата у књигу евиденције.


Главни лабораторијски техничар одсека Лабораторије/Лабораторијски техничар одговоран је за пријем пацијената и узимање крви, припрему крвног узорка за анализу тј. издвајање серума и његово складиштење до извођења саме анализе, вођење књиге евиденције пацијената, извођења дела лабораторијских анализа (према договору) и издавање резултата пацијенту.

5. ОПИС ПРОЦЕДУРЕ

Процедура за квантитативно одређивање концентрација полних хормона (естрадиол, фоликулостимулирајући хормон (ФСХ) и лутеинизирајући хормон (ЛХ)) из серума пацијената *ELISA* методом (директна и компетитивна)

5.1. Принцип *ELISA* методе

Компетитивна *ELISA* се заснива на компетитивној интеракцији између естрадиола (стандарди и серуми) и естрадиола коњугованог са пероксидазом (ензим-антиген коњугат) за ограничени број анти-естрадиол антитела којима су обложени микротитарски стрипови. Визуелизација реакције се добија на основу бојене реакције између пероксидазе и субстрата (тетраметилбензидин).

 <p>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</p>	Назив процедуре: Процедура одређивање концентрације полних хормона (естрадиол, ФСХ, ЛХ) из серума пацијената <i>ELISA</i> методом		Ознака: П.ЕОЛ.04
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 3 од 6

Директна *ELISA* се заснива на формирању имунокомплекса између стрептавидина (којим се обложени микротитарски стрипови) и биотинилизованог, пероксидазом обележеног антитела на одговарајући хормон (ФСХ и ЛХ) саи одговарајућимег хормоном (ФСХ и ЛХ) у серуму или стандарду. Визуелизација реакције се добија на основу бојене реакције између пероксидазе и субстрата (тетраметилбензидин).

Процедура је идентична и за компетитивно и за директно одређивање, осим разлика у количинама додатих реагенаса.

5.2. Активности:

5.2.1 Пријем пацијената

Лабораторијски техничар ОЕО проверава комплетност документације пацијента (Здравствену књижицу и Упут) и податке уноси у Хелијант.

5.2.2. Вођење књига евиденције

Лабораторијски техничар ОЕО који ради вађење крви, води књигу евиденције према врсти анализе и уписује:

- име, презиме и годиште пацијента;
- број историје болести
- име и презиме лекара који га шаље
- одређене датуме за сукцесивна вађења крви

5.2.3. Извођење лабораторијских анализа

Одређивање концентрација сва три хормона се раде истовремено. Према договору, припреме за анализе ради лабораторијски техничар ОЕО, саму анализу ради лабораторијски техничар ОЕО или заједно са В.О.К. у зависности од обима посла, а добијање коначних резултата на читачу и прерачунавање ради В.О.К.

5.2.3.1. Издвајање серума:

Лабораторијски техничар ОЕО узима крв пацијенту на за те потребе предвиђеном месту.

5-10 ml венске крви (венепункција) се остави да коагулише на собној темепратури 30 минута до 1 сат. Пипетом се издвоји серум и центрифугира 10 минута на 2000 грм, на собној темепратури. Добијени супернатант се распоређује у одговарајући број епрувета, које се обележавају бројем, именом и презименом и замрзавају.


5.2.3.2. Чување реагенаса и узорака:

Серуми се чувају на -20 °С. Узорци се могу одмрзавати само једном. За анализу се не могу користити високо липемични и хемолизирани узорци.

Тест реагенси су стабилни до наведених датума на 2-8 °С и не користе се по истеку наведених датума. Након отварања, могу се користити до 60 дана од отварања, на 2-8 °С. Није препоручљиво користити реагенсе из различитих серија.

*5.2.3.3. Процедурални поступак *ELISA* методе*

Пре почетка рада пажљиво обележити положај чашица са стандардима и узорцима на радном листу из теста. Пре почетка теста све реагенсе оставити да стоје на собној температури око 30 минута. Одговарајући број микротитарских стрипова поставити чврсто у носач.

 <p>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</p>	Назив процедуре: Процедура одређивање концентрације полних хормона (естрадиол, ФСХ, ЛХ) из серума пацијената <i>ELISA</i> методом		Ознака: П.ЕОЛ.04
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 4 од 6

У одговарајуће редове микротитарских стрипова додати одговарајућу (назначену) количину стандарда (одговарајућих) хормона у дупликату и редом назначену количину одговарајућих серума у дупликату, а према раније установљеном редоследу. Пипетирати тачно на дно чашица. Неопходно је водити рачуна да пипетирање узорка не траје дуже од 10 минута. Због репродуцибилности резултата, увек треба додавати реагенсе истим редоследом и истом брзином како би реакциона времена била подједнака.

У чашице са стандардима и узорцима додати одговарајући ензимски конјугат, назначене количине (пероксидазом обележено биотинилизовано антитело на одговарајући хормон). Благо промешати и покрити чашице самолепљивом фолијом и инкубирати 1 сат на собној температури.

После инкубације уклонити фолију, а вишак течности одстранити (одливањем или аспирирањем).

Испрати микротитарске чашице 3 пута са одговарајућом течношћу за испирање, коришћењем мултиканалне пипете.

Додати назначену количину субстратног реагенса и инкубирати 15 минута на собној температури. Водити рачуна да нема мехурића у чашицама током инкубације, а препоручљиво је покрити фолијом због развијања боје.

За заустављање реакције, додаје се одговарајућа количина стоп реагенса и пажљиво промеша. Уколико постоје мехурићи неопходно их је уклонити.


Апсорбанца се мери на 450 nm на одговарајућем читачу, најкасније 30 минута од заустављања реакције, уз коришћење додатне таласне дужине од 630-690 nm (уколико постоји техничка могућност). На основу добијених апсорбанци за одговарајуће стандардне концентрације, конструише се стандардна крива и на основу ње и добијених апсорбанци за узорке, одређују се непознате концентрације одговарајући хормона из серума. За сваки нови тест мора се конструисати нова стандардна крива.

5.4. Издавање резултата

Резултате уписује у свеску евиденције резултата В.О.К. који је тог дана према унапред направљеном распореду изводио анализу.

У извештају анализе су наведени следећи подаци:

- хормон који је одређиван, а и одговарајуће референтне вредности;
- име и презиме пацијента са назначеним бројем историје болести;
- датум узимања сваког узорка (уколико су у питању сукцесивна вађења крви);
- одређену вредност концентрације датог хормона за сваки узорак (према датуму узимања узорка крви) и
- датум када је урађена анализа
- потпис В.О.К.-а који је према договору радио/обрађивао резултате анализе
- потпис шефа лабораторије

 ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ	Назив процедуре: Процедура одређивање концентрације полних хормона (естрадиол, ФСХ, ЛХ) из серума пацијената <i>ELISA</i> методом		Ознака: П.ЕОЛ.04
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 5 од 6

5.5. Расподела и архивирање готових лабораторијских анализа

Шеф лабораторије или В.О.К. компјутерски бележи, штампа или чува резултате. Лабораторијски техничар ОЕО издаје резултате пацијенту (потребно је да се у свеску евиденције резултата наведе и када је резултат дат). Главни лабораторијски техничар ОЕО прави месечни извештај о броју и врсти извршених анализа.

5.6. Одлагање материјала по завршеној анализи

Све узорке крви пацијената, потребно је третирати као потенцијално инфективни материјал.

У складу са тиме, даљи поступци укључују:

- Дезинфиковање (аутоклавирањем и/или хемијским средствима) целокупног материјала које је контаминирано са хуманим узорцима и са реагенсима из самог теста, а у складу са одговарајућим прописима.
- Одлагање биолошког отпада, а на основу процедуре безбедности и заштите на раду одељења.

6. ДОКУМЕНТА И ЗАПИСИ КОЈИ СЕ ЧУВАЈУ

- Књиге евиденције
- Формулар за резултате у е-форми
- Издати резултати у е-форми