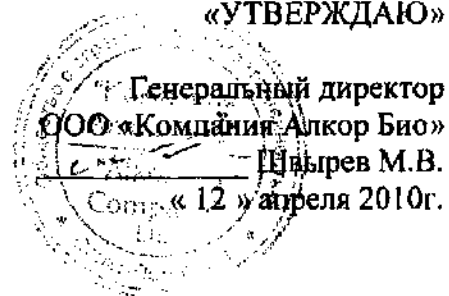


«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора

от « » 20 г. №

«УТВЕРЖДАЮ»



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНСУЛЬФАТА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«СтероидИФА-ДГЭА-сульфат»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» предназначен для количественного определения концентрации дегидроэпиандростеронсульфата в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Дегидроэпиандростеронсульфат (ДГЭА-С) является стероидным гормоном, продуцируемым главным образом надпочечниками. Функции ДГЭА-С в организме четко не определены, гормон обладает слабым андрогенным эффектом. В периферических тканях гормон способен превращаться в сильный андроген — тестостерон. В кровотоке ДГЭА-С не связывается со специальными транспортными белками, его уровень не подвержен суточным колебаниям. Определение уровня ДГЭА-С в сыворотке крови имеет важное значение при дифференциальной диагностике заболеваний яичников, для оценки функции надпочечников при половом развитии у детей, при дифференциальной диагностике синдрома и болезни Кушинга.

1.3. Набор «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. При одновременном добавлении в лунки исследуемого образца, конъюгата ДГЭА-С-пероксидазы и антител к ДГЭА-С во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным ДГЭА-сульфатом сыворотки в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству ДГЭА-С в исследуемом образце (Рис.1).

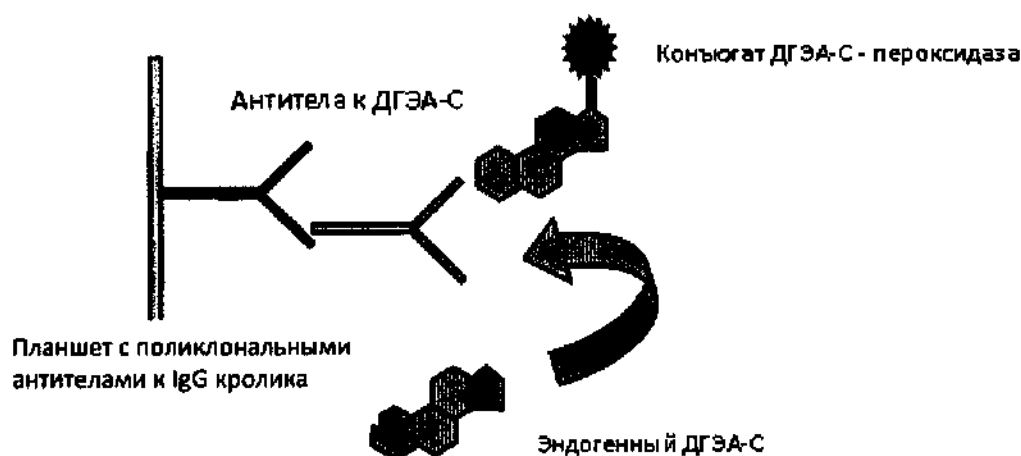


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации ДГЭА-С в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ДГЭА-С в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок поликлональными антителами к IgG кролика, маркирован «Стрипы с антителами к IgG кролика» – 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества ДГЭА-С. Точные значения концентраций ДГЭА-С в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 10 мкг/мл – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат ДГЭА-С-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (14 мл);
- раствор антител к ДГЭА-С, маркирован «Антитела к ДГЭА-С» – 1 флакон (14 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» – 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ДГЭА-С, маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к ДГЭА-С с другими стероидами приведена в таблице 1.

Таблица 1

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
ДГЭА-С	100
ДГЭА	50
Другие родственные стероиды	<1

3.2. Коэффициент вариации результатов определения ДГЭА-С в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ДГЭА-С в анализируемых образцах при разведении их сывороткой крови, не содержащей ДГЭА-С, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ДГЭА-С — проверка соответствия значения определяемой концентрации ДГЭА-С расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КП №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ДГЭА-С в сыворотке крови человека не превышает 0,04 мкг/мл.

3.6. Диапазон ожидаемых значений. Концентрацию ДГЭА-С измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов, у 40 здоровых мужчин в возрасте 21–39 лет, 120 здоровых женщин в возрасте 19–39 лет в различных фазах менструального цикла, 15 женщин в возрасте 49–65 лет в постменопаузе и 25 беременных женщин. Средняя концентрация ДГЭА-С у мужчин составила 2,7 мкг/мл (1,0–4,2 мкг/мл), у женщин в возрасте 19–39 лет – 2,4 мкг/мл (0,8–3,9 мкг/мл), у женщин в постменопаузе – 1,35 мкг/мл (0,1–2,5 мкг/мл), у беременных женщин – 0,7 мкг/мл (0,2–1,2 мкг/мл).

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: в наборе «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» значения концентраций калибровочных проб выражены в мкг/мл. Для пересчета концентраций ДГЭА-С в мкмоль/л необходимо значение концентрации в мкг/мл умножить на 2,7.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 И раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

— Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

— прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;

— пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;

— пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

— цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–500 мл;

— стакан стеклянный подходящего объема;

— вода дистиллированная;

— бумага фильтровальная;

— перчатки резиновые или пластиковые;

— 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

— контейнер для дезинфекции;

— ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется алиquotировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°C или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Раствор антител к ДГЭА-С готов к использованию. Расход раствора антител к ДГЭА-С на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

В приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – №2 для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – №3 для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – №4 для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – №5 для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – №6 для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – №7 для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации

разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.3. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата ДГЭА-С-пероксидаза.

7.2.4. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл раствора антител к ДГЭА-С.

7.2.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

Примечание: максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.

7.2.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

7.2.9. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.8., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре $+18...25^{\circ}\text{C}$.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации ДГЭА-С в калибровочных пробах (мкг/мл) (Рис. 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо пользоваться формулой 1 или 2.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

$$B/B_1 \times 100\%, \quad (1)$$

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то использовать формулу:

$$(B-B_T)/(B_1-B_T) \times 100\%, \quad (2)$$

где B — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_1 — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1,

B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.

9.2. Определить содержание ДГЭА-С в пробах по калибровочному графику.

9.3. Для образцов крови со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора (B_1) принимать значение концентрации «ниже 0,04 мкг/мл».

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации ДГЭА-С, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

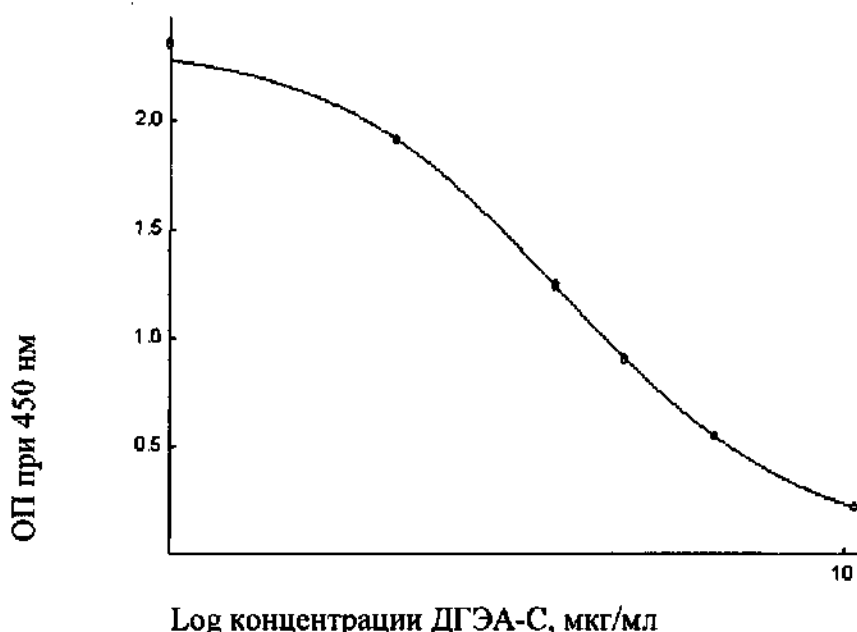


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

— стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

— жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

— восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

— конъюгат Е, раствор антител к ДГЭА-С и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

— промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;

— буфер Р и стоп-реагент хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

— количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;

— для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ДГЭА-сульфат в контрольной сыворотке;

— запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ, раствора антител к ДГЭА-С и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

— из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, телефон/факс: (812) 596-76-80.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»

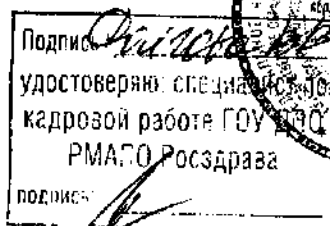


Шварев М.В.

Руководитель лаборатории
разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
«РМАПО Росздрава»



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

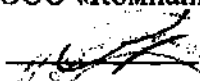
СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Темпера- тура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	50 мкл КП и КС	КТ (+18... 25°C)	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		50 мкл исследуемых образцов			
3		100 мкл конъюгата ДГЭА- С- пероксидаза			
4		100 мкл раствора антител к ДГЭА-С			
5	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800об/мин
6	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор= 14 мл буфера Р + 266 мл Н ₂ О
7	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
8	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15-30'	В темноте
9	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
10	Перемешивание	—	КТ	1 – 2'	Шейкер
11	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
12	Обработка результатов	—			Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО

Примечания: КП – калибровочная проба; КС – контрольная сыворотка; ОП – оптическая плотность; КТ – комнатная температура (+18...25°C); ПО – программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) листов
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

 М.В. Швырев

