

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора

от « » 20 г. №

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Цырев М.В.
«13» апреля 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СЕКС-СТЕРОИДСВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ИФА-ССГ»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА-ССГ» предназначен для количественного определения секс-стероидсвязывающего глобулина (ССГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ССГ — белок сыворотки крови, связывающий половые стероидные гормоны. Это димерный гликопротеин, синтезируемый в печени, его молекулярная масса варьирует от 80 до 100 кДа в зависимости от степени гликозилирования.

В крови стероидные гормоны частично находятся в свободном состоянии, а частично — в связанном с альбумином и со специфическим белком (для половых стероидов это ССГ). Фракция полового стероидного гормона, которая не связана с ССГ (так называемый биодоступный гормон), может выполнять свою регуляторную функцию в клетках-мишенях. Биодоступными являются и те стероиды, которые связаны с альбумином, так как слабая связь с альбумином не препятствует диффузии гормона в клетки-мишени.

Максимальную аффинность ССГ проявляет к андрогенам, меньшую — к эстрогенам. Половые стероиды влияют на синтез ССГ: эстрогены обладают стимулирующим эффектом, а андрогены — ингибирующим.

У здоровых людей содержание ССГ в крови варьирует в широких пределах. У женщин значения ССГ в среднем выше, чем у мужчин. Уровень ССГ повышается при гипертиреозе, гиперэстрогении (беременность, приём эстрогенов в составе оральных контрацептивов и т. п., цирроз печени, лютеиновая фаза цикла). У взрослых мужчин с возрастом за счет повышения концентрации ССГ количество биодоступного тестостерона постепенно уменьшается. У женщин понижение уровня ССГ коррелирует с наличием гиперандрогенных состояний (синдром поликистозных яичников, врожденная дисфункция коры надпочечников, гирсутизм). Умеренное снижение уровня ССГ наблюдается также при гипотиреозе, болезни Кушинга, гиперпролактинемии, акромегалии, после терапии андрогенами (или прогестинами, оказывающими андрогенный эффект).

Значение ССГ используется при определении индекса свободных андрогенов, который вычисляется как отношение концентрации общего тестостерона к ССГ.

1.3. Набор «ИФА-ССГ» 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 «ИФА-ССГ» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ССГ. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ССГ-пероксидазы, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ССГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ССГ-пероксидазы, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ССГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ССГ в исследуемом образце (см. Рис.1).

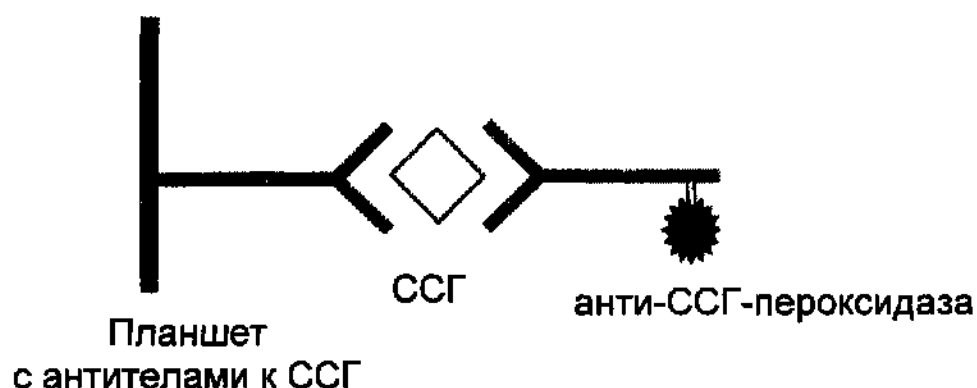


Рисунок 1. Схема анализа

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

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ССГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ССГ» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества ССГ. Точные значения концентраций ССГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные — 0; 5; 20; 50; 100; 200 нмоль/л — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ССГ-пероксидазы, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (20 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 ССГ, 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. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к ССГ с тироксин-связывающим глобулином (ТСГ) и кортико-костероид-связывающим глобулином (транскортином).

3.2. Коэффициент вариации результатов определения ССГ в одном и том же образце с использованием набора «ИФА-ССГ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ССГ в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ССГ — проверка соответствия значения определяемой концентрации ССГ расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КП №4. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ССГ в сыворотке крови человека не превышает 2 нмоль/л.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ИФА-ССГ» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ССГ 10 000 нмоль/л.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Содержание ССГ измеряли у 70 здоровых мужчин и 85 здоровых небеременных женщин. Диапазон измеренных концентраций составил: у мужчин 12,4–78,4 нмоль/л (медиана 38,5 нмоль/л), у женщин 14,1–129 нмоль/л (медиана 67 нмоль/л).

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.

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 Н 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 с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- 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 аликвотировать 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. Буфер Д готов к использованию.

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.

7.1.9. Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и КС) должны быть разведены буфером Д в 20 раз (Образец №1). Разводить сыворотку крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сывороток необходимо делать новое разведение. Пример подготовки образца сыворотки к анализу:

Образец №1 (разведение в 20 раз):

380 мкл буфера Д и 20 мкл исследуемого образца.

Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. п. 9.3.) значения концентрации ССГ в исследуемых образцах выше КП №6, следует приготовить дополнительное разведение еще в 20 раз (Образец №2).

Образец №2 (дополнительное разведение в 20 раз): 380 мкл буфера Д и 20 мкл образца №1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

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 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 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 лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-ССГ-пероксидаза.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. 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.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°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.

7.2.7. 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.

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре +18...25°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 ССГ (нмоль/л) в калибровочных пробах (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 использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

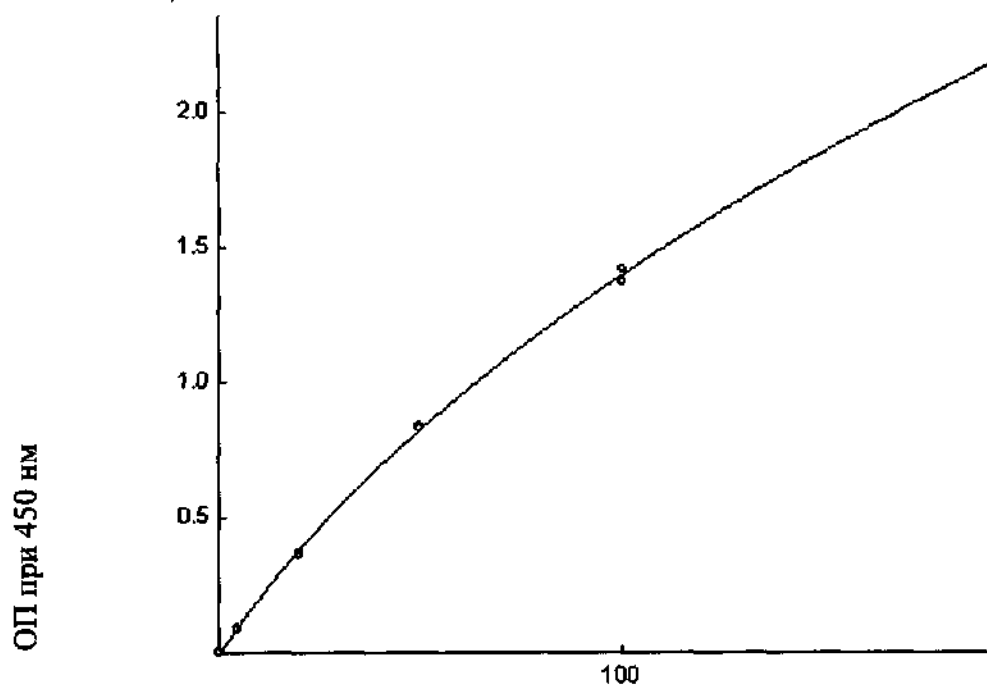
$$B - B_T$$

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

B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание ССГ в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ССГ умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации ССГ, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.9.



Концентрация ССГ, МЕ/мл
Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-ССГ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ 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, буфер Д 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 после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

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

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ССГ в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ 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 «ИФА-ССГ» 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»



Швырев М.В.

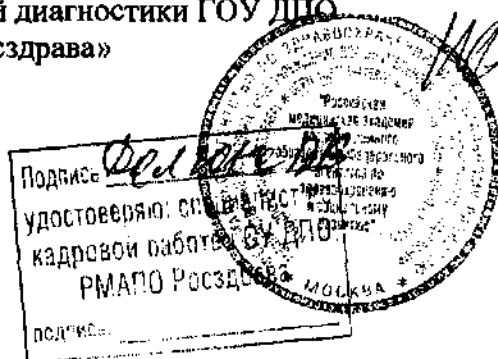
Руководитель лаборатории
разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	20 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		20 мкл исследуемых образцов			
3		—100 мкл конъюгата анти-ССГ-пероксидазы			
4	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15-30'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание	—	КТ	1 – 2'	шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
11	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 9 (девять) листов
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

М.В. Швырев

