

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО НПО «Литех»

«*Говорун*» 2007 г.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 200 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного определения
дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) в сыворотке крови человека
методом иммуноферментного анализа
(ИФА-ДГЭА-С)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор ИФА-ДГЭА-С предназначен для количественного определения концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемого образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений.

1.3. ДГЭА-С - стероидный гормон, который продуцируется главным образом надпочечниками и относится к кетостероидам. Благодаря высокой концентрации ДГЭА-С в крови, длительного периода полужизни и высокой стабильности, а также потому, что его источником, в основном, являются надпочечники, ДГЭА-С, хотя и обладает слабым андрогенным эффектом, является отличным индикатором андрогенной секреции. В периферических тканях ДГЭА-С способен превращаться в сильный андроген – тестостерон. Определение уровня ДГЭА-С имеет важное значение для дифференциальной диагностики заболеваний яичников, дифференциальной диагностики синдрома и болезни Кушинга, при заболеваниях надпочечников (например, при наличии опухолей), задержке полового развития у детей.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение основано на одностадийном варианте твердофазного иммуноферментного анализа, при котором происходит конкуренция ДГЭА-С в анализируемом образце с ДГЭА-С, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат), за связывание с моноклональными антителами к ДГЭА-С, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляются во время отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс выявляется ферментативной реакцией при добавлении субстрата и хромогена (тетраметилбензидина). Интенсивность окраски продукта окисления хромогена обратно пропорциональна содержанию ДГЭА-С в анализируемой пробе.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сорбированный мышиными моноклональными IgG-антителами к ДГЭА-С, готовый для использования - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ДГЭА-С: 0 мкг/мл (1,0 мл); 0,1; 0,4; 1,0; 4,0; 10,0 мкг/мл (по 0,8 мл); концентрации ДГЭА-С в калибровочных пробах могут незначительно отличаться от указанных величин, точные значения указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 пробирок;
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ДГЭА-С, готовая для использования - 1 пробирка (0,3 мл);
- конъюгат ДГЭА-С с пероксидазой хрена, готовый для использования - 1 флакон (12,0 мл);
- раствор для разведения сывороток: фосфатный буфер, 5 х концентрат – 1 флакон (20мл);
- отмывочный раствор: фосфатно-солевой буфер с 0,05% твин-20, рН 7,2-7,4, 20-кратный концентрат – 1 флакон (50,0 мл);
- раствор хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 11-кратный концентрат – 1 пробирка (1,5 мл);
- субстратный буфер, содержащий перекись водорода – 1 флакон (15,0 мл);
- стоп-реагент (кислота серная, 1 М), готовый для использования – 1 флакон (15,0 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Перекрестная реакция ДГЭА-С с другими стероидами приведена в таблице 1.

Таблица 1

Вещество	Перекрестная реакция, %
ДГЭА-С	100
ДГЭА	90
Этиохолоналон-S-Na	0,2
5-альфа-андростандион	0,01
Тестостерон	0,01
Прогестерон	0,01
17-альфа-ОН-прогестерон	0,01
Эстрон	0,01
Кортизол	0,001
Холестерол	0,001

4.1 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ДГЭА-С не превышает 0,05 мкг/мл.

4.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ДГЭА-С в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ИФА-ДГЭА-С не превышает 8%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ДГЭА-С - соответствие измеренной концентрации ДГЭА-С предписанной концентрации в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,4 мкг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Линейность. Зависимость концентрации ДГЭА-С в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ДГЭА-С, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,1 – 10 мкг/мл и составляет $\pm 10\%$.

4.6. Клиническая проверка. Содержание ДГЭА-С измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов, у 25 здоровых мужчин в возрасте 20-42 лет, 115 здоровых женщин в возрасте 18-37 лет в различных фазах менструального цикла, 14 женщин в возрасте 44- 51 лет в менопаузе, 24 беременных женщин, 16 новорожденных и 12 здоровых детей в возрасте 1-12 лет. Средние концентрации ДГЭА-С в сыворотке крови в мкг/мл указаны в таблице 2.

Таблица 2

Возрастная группа	Женщины	Мужчины
Новорожденные	0,9 – 1,8	0,9 – 1,8
Пубертатный возраст	0,25 – 1,0	0,25 – 1,0
Взрослые	0,9 – 3,6	0,9 – 3,6
Постменопауза	<0,25 – 1,0	
Беременность	0,25 – 1,8	

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора реагентов ИФА-ДГЭА-С уточнить значения концентраций ДГЭА-С, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента людей.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. Стоп-реагент (серная кислота) действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы ее следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

5.4. Тетраметилбензидин (ТМБ), субстратный буфер и рабочий раствор ТМБ чувствительны к воздействию солнечного света; необходимо также исключить их контакт с окислителями и металлами.

5.5. 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.).

5.6. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и другие возбудители вирусных инфекций.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру +37°C, или планшетный шейкер-термостат на температуру +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными

наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100-300 мкл;
- мерные сосуды на 100 и 1000 мл;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- липкая лента для заклеивания планшета;
- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови человека.

До проведения анализа возможно хранение образцов сыворотки крови при температуре $+(2 - 8) ^\circ\text{C}$ не более 2 дней. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить и хранить при температуре $-20 ^\circ\text{C}$ (и ниже) не более 3 месяцев. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов сыворотки крови.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. Приготовление рабочего отмывочного раствора. Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего раствора при температуре $+(2 - 8) ^\circ\text{C}$ – не более 1 месяца.

Для анализа четырех стрипов: 16 мл концентрата довести до 320 мл дистиллированной водой.

8.2. Приготовление рабочего раствора ТМБ. Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Для анализа четырех стрипов: 0,4 мл концентрата ТМБ смешать с 4 мл субстратного буфера.

8.3. Приготовление рабочего раствора для разведения сывороток. Концентрат раствора для разведения сывороток развести дистиллированной водой в 5 раз.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови при комнатной температуре $+(18-25) ^\circ\text{C}$ в течение времени не менее 30 минут. *Пакет с планшетом не открывать!* Встряхнуть все компоненты набора.

9.2. Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок [(количество анализируемых образцов + 6 калибровочных проб + 1 контрольная сыворотка) x 2] и поместить стрипы в рамку. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с осушителем должен оставаться внутри). Хранить оставшиеся стрипы при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев.

9.3. Внести в соответствующие лунки (в дубликатах) по 30 мкл каждой калибровочной пробы (начиная с минимальной концентрации), контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки крови.

9.4. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Конъюгат вносить в лунки планшета в той же последовательности, что и калибровочные пробы, контрольную сыворотку и исследуемые образцы. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых образцов сыворотки крови и конъюгата не должно превышать 10 минут.*

9.5. Заклеить планшет липкой лентой. Осторожно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 секунд и инкубировать в течение 60 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$.

9.6. Содержимое лунок удалить декантированием и затем промыть лунки планшета 5 раз рабочим отмывочным раствором (см п. 8.1), внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.7. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см п. 8.2) в той же последовательности, что и конъюгат.

9.8. Инкубировать планшет в темном месте при комнатной температуре $(+18-25)^{\circ}\text{C}$ в течение 10-15 минут в зависимости от степени изменения окраски.

9.9. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реagenta. Тщательно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 секунд.

9.10. Провести измерение величины оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм. Длительность процедуры измерения оптической плотности не должна превышать 15 минут (до измерения хранить планшет в защищенном от солнечного света месте).

10. РАСЧЕТЫ

10.1. Рассчитать средние арифметические значения показателей оптической плотности контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки крови.

10.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось Y) от концентрации ДГЭА-С в калибровочных пробах (ось X).

10.3. Определить по калибровочному графику концентрацию ДГЭА-С в анализируемых образцах сыворотки крови и в контрольной сыворотке.

10.4. При построении калибровочного графика и определении концентрации ДГЭА-С в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора иммуноферментных реакций рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.

10.5. Для выражения концентрации ДГЭА-С в мкмоль/л значения, полученные в мкг/мл, следует умножить на коэффициент 2,6.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.

11.1. Набор реагентов ДГЭА-С должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре + (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 3 суток.

11.2. Срок годности набора – 1 год.

11.3. В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытый планшет можно хранить в плотно закрытом пакете с осушителем при температуре +(2-8)°С не более 3 месяцев;

- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, конъюгат, концентрат ТМБ, раствор для разведения сывороток и субстратный буфер после вскрытия флаконов можно хранить при температуре +2-8° С не более 2 месяцев;

- рабочий отмывочный раствор можно хранить в закрытой емкости при температуре +2-8°С не более 1 месяца;

- рабочий раствор ТМБ хранению не подлежит;

- стоп-реагент можно хранить в закрытой емкости при комнатной температуре (+18-25°С) в течение всего срока годности набора.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме того, рекомендуется определение содержания ДГЭА-С в контрольной сыворотке.

11.5. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия. Правильность значений полученных концентраций ДГЭА-С может быть поставлена под

сомнение при анализе сыворотки крови, полученной от пациента, принимавшего кортизол или другие природные и синтетические стероиды.

11.6. Не допускается использование раствора ТМБ и стоп-реагента из наборов других фирм-производителей.

11.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, телефон/факс: (495)246-45-01, или (e.mail) info@lytech.ru или в ИСКЛС ФГУ НЦЭСМП Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (495)120-60-95; 120-60-96.

Директор ООО НПФ «Литех»

Т.Л. Говорун

Согласовано:

Проф. В.В. Долгов,
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО



Подпись *В.В. Долгов*
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись *В.В. Долгов* 19.02.2008