«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от «05» марта 2011 г. № 991-Пр/11

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 дегидроэпиандростеронсульфата (далее ДГЭА-С) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. 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 ко-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лебаниям. 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-пероксидаза и антител к ДГЭА-С во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным ДГЭА-сульфатом сыворотки крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству ДГЭА-С в исследуемом образце (Рисунок 1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

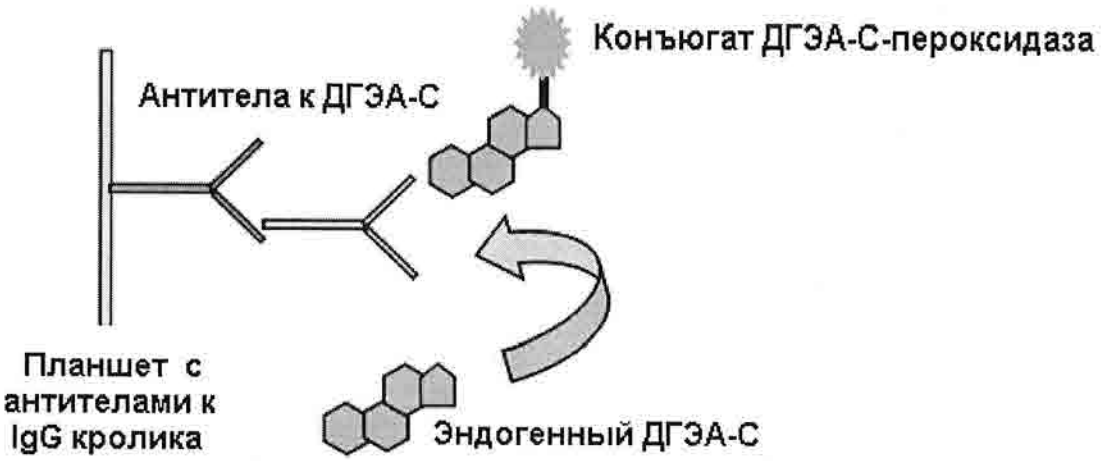


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором 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. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций ДГЭА-С в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10 мкг/мл – 6 флаконов (лиофилизованные 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 (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 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 калибровочной пробы №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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 в мкмоль/л необходимо значение концентрации в мкг/мл умножить на 2,7.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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°С;
- 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и 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°С) 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 лиофилизованных 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°С) 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 готов к использованию. Расход конъюгата 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.

На странице 18 приведена схема проведения анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.3. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 100 мкл конъюгата.

7.2.4. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 100 мкл раствора антител к ДГЭА-С.

7.2.5. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании **в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 500–800 об/мин.**

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок 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 добавить 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°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

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, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

7.2.9. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.8.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках план-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

шета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре (+18...25°С).

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.*

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 А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: *среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации ДГЭА-С (мкг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 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 А1 и А2 из значений

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

$$B/B_1 x100\%, \quad (1)$$

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.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то использовать формулу:

$$(B-B_T)/(B_1-B_T)x100\%, \quad (2)$$

где B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

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

9.3. Для образцов сыворотки 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».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

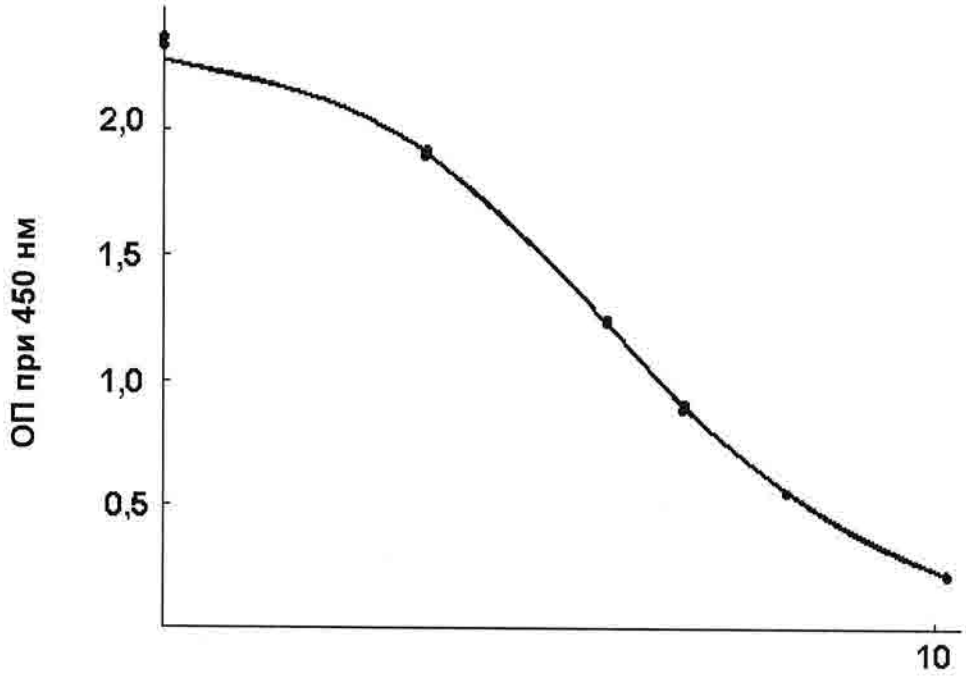


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

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°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;

- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизованных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- конъюгат, раствор антител к ДГЭА-С и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°С) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых 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-С в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ, раствора антител к ДГЭА-С и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 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, входящих в состав данного набора реагентов.

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

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

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

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	***50 мкл*** *КП и КС*	***КТ (+18… 25°С)***	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*			
4		***100 мкл*** *раствора антител к ДГЭА-С*			
5	**Инкубация**	—	***+37°С***	60’	Термостатируемый **шейкер**, 500 – 800 об/мин
6	Промывка	***300 мкл*** в лунку ***1*промывочного раствора*** (4 раза)			**1***промывочный раствор= = 14 мл буфера Р + 266 мл H_2O
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°С);
ПО – программное обеспечение.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора «СтероидИФА-ДГЭА-сульфат» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит.А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru