

В.Е. Акимочкин
«24» декабря 2003 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОН-СУЛЬФАТА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
(СтероидИФА-ДГЭА-сульфат)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 8 от 22 сентября 2003 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов СтероидИФА-ДГЭА-сульфат предназначен для количественного определения содержания дегидроэпиандростерон-сульфата в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С) является стероидным гормоном с молекулярной массой 368,4 Да, 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, у него отсутствует суточный ритм. Определение уровня ДГЭА-С в сыворотке крови имеет важное значение при дифференциальной диагностике заболеваний яичников, для оценки функции надпочечников при нарушении полового развития 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.

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

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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-С сыворотки крови за связывание с поликлональными кроличьими антителами к ДГЭА-С. Одновременно происходит связывание антител к ДГЭА-С с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок козьими поликлональными антителами к иммуноглобулинам кролика. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата ДГЭА-С-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству ДГЭА-С в анализируемом образце сыворотки крови. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата ДГЭА-С-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ДГЭА-С в исследуемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- Комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованными антителами против IgG кролика, маркирован «Стрипы с антителами против IgG кролика» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ДГЭА-С; концентрации ДГЭА-С в калибровочных указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат ДГЭА-С с пероксидазой, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- раствор антител к ДГЭА-С, маркирован «Антитела к ДГЭА-С» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);

- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ДГЭА-С, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

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

Таблица

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

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

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ДГЭА-С в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ДГЭА-С, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет ±10%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ДГЭА-С — соответствие измеренной концентрации ДГЭА-С предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3. Процент открытия составляет 90–110.

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

4.6. 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 2,6.

4.7. Клиническая проверка. Содержание ДГЭА-С измеряли в сыворотке крови, взятой в случайной выборке лиц натошак из локтевой вены в 8 до 9 часов. У 40 здоровых мужчин в возрасте 21 – 39 лет средняя концентрация ДГЭА-С составила 2,7 мкг/мл (1,0–4,2 мкг/мл) (данные Алкор Био).

Концентрация ДГЭА-С в сыворотке крови здоровых женщин разного возраста представлена в таблице 2 и женщин на разных сроках беременности — в таблице 3.

Таблица 2¹

Возраст	Число обследованных, n	Концентрация ДГЭА-С, мкг/мл		
		Медиана	5%-ный перцентиль	95%-ный перцентиль
1,5 мес–3 года	44	0,04	0,00	0,45
4–8 лет	27	0,16	0,00	1,36
9–10 лет	27	0,48	0,06	1,70
11–13 лет	35	1,03	0,12	2,45
14–17 лет	43	1,45	0,18	3,55
18–29 лет	100	2,45	0,37	5,70
30–39 лет	71	1,75	0,86	5,00
40–49 лет	69	1,50	0,34	2,75
50–59 лет	68	0,82	0,18	2,90
60–69 лет	21	0,72	0,25	1,85
70 лет и старше	15	0,37	0,06	

1 - Храмова Е.Б., Суплотова Л.А., Южакова Н.Ю., Макарова О.Б., Аксенова Н.В., Баглык Е.А. «Возрастные особенности содержания дегидроэпиандростерон-сульфата в сыворотки крови женщин, проживающих на территории Западной Сибири». Медицинская наука и образование Урала, 2006 (1): 72–75;

Таблица 3²

Период гестации	Средний срок гестации, недель	Возраст, лет (Средний возраст)	Число обследованных, n	Концентрация ДГЭА-С, мкг/мл		
				Медиана	2,5%-ный перцентиль	97,5%-ный перцентиль
I триместр (5–12 недель)	8,5±2,0	18–45 (24,8±5,0)	50	1,48	0,43	3,20
II триместр (12–28 недель)	18,8±4,4	16–35 (24,7±4,5)	47	1,04	0,46	2,80
III триместр (29–36 недель)	32,0±2,3	17–38 (25,1±5,6)	51	0,89	0,34	2,33

2 - Суплотова Л.А., Храмова Е.Б., Южакова Н.Ю., Макарова О. Б., Фомина С.В., Старкова О.Б., Кукарская И.И. «Оптимизация методики гормональной диагностики гиперандрогении у беременных женщин». Медицинская наука и образование Урала, 2006 (1): 82–85.

4.8.Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ДГЭА-С, соответствующие нормальным.

5.МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1.Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2.Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3.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.).

5.4.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.

5.5.При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

6.ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

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

·прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;

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

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

·цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;

·стакан стеклянный вместимостью 300 мл;

·вода дистиллированная;

·бумага фильтровальная;

·перчатки резиновые или пластиковые.

7.ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1.Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2.Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.3.Раствор антител к ДГЭА-С готов к использованию.

7.4. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

- Например: 5 мл Буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.
- Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.
- 7.5.Конъюгат ДГЭА-С-пероксидаза готов к использованию.
- 7.6.Раствор ТМБ готов к использованию.
- 7.7.Стоп-реагент готов к использованию.

8.ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1.Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. На последней странице приведена схема проведения анализа.

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

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

B1, B2—№ 2 для калибровочной пробы № 1;

C1, C2—№ 3 для калибровочной пробы № 2;

D1, D2—№ 4 для калибровочной пробы № 3;

E1, E2—№ 5 для калибровочной пробы № 4;

F1, F2—№ 6 для калибровочной пробы № 5;

G1, G2—№ 7 для калибровочной пробы № 6;

H1, H2—№ 8 для контрольной сыворотки.

8.3.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 контрольных и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

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

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

8.6.Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C с частотой 500–800 об/мин.

8.7.По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.4, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.8.Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.9.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 1–2 минут.

8.10.Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу $V/V_0 \times 100\%$ для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, V_0 — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0 мкг/мл. В координатах logit-log построить калибровочный график зависимости $V/V_0 \times 100\%$ от концентрации ДГЭА-С в калибровочных пробах (мкг/мл).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой $(V-V_T)/(V_0-V_T) \times 100\%$, где V_T — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание ДГЭА-С в пробах по калибровочному графику.

8.11.Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.9, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение 20 минут при температуре +2...8°C.

9.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1.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.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;

·конъюгат ДГЭА-С-пероксидаза, раствор антител к ДГЭА-С и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;

·промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);

·Буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в течение всего срока годности при температуре +2...8°C.

9.2.Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную и мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

9.3.Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4.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-С в контрольной сыворотке.

9.5.Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6.Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п.8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
КП № 1, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Конъюгат ДГЭА-Спероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
Раствор антител к ДГЭА-С, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 1	1 час, термостатируемый шейкер, +37° С								
4-кратная промывка:	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х
промывочный буфер, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП – калибровочная проба;

КС – контрольная сыворотка;

С х – анализируемые пробы;

ОП – оптическая плотность;

К Т – комнатная температура (+18...25°C).