

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения и
социального развития

_____ Р.У. Хабриев

«__» _____ 2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СЕКС-СТЕРОИДСВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
(ИФА-ССГ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ИФА-ССГ предназначен для количественного определения содержания 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 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.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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-пероксидаза, 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-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ССГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ССГ в исследуемом образце.

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

3. СОСТАВ НАБОРА

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ССГ, маркирован «Стрипы с иммобилизованными моноклональными антителами к ССГ» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, содержащие известные количества; концентрации ССГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ССГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- буфер для разведения образцов сывороток крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (20 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ССГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл);
- «Стоп-реагент» (1Н соляная кислота) — 1 флакон (14 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к ССГ с тироксин-связывающим глобулином (ТСГ) и кортикостероид-связывающим глобулином (транскортином).

4.2. Коэффициент вариации результатов определения ССГ в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ИФА-ССГ не превышает 8%.

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

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ССГ — соответствие измеренной концентрации ССГ 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 ССГ в сыворотке крови человека не превышает 2нмоль/л.

4.6. 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 14000 нмоль/л.

4.7. Клиническая проверка. 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).

4.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ССГ, 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 1N 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 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 лунках 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 1000–5000мкл;
- 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. Буфер Д готов к использованию.

7.3. Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и КС) должны быть разведены Буфером Д в 20 раз (Образец №1). Если значение ССГ в исследуемых образцах по предварительным данным превышает значение калибровочной пробы №6, следует приготовить дополнительное разведение еще в 20 раз (Образец № 2).

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 20мкл исследуемого образца.

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

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.4. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) 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.

7.5. Конъюгат анти-ССГ-пероксидаза готов к использованию.

7.6. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз.

Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.7. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). 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 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл предварительно разведенной исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

8.4. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата анти-ССГ-пероксидаза.

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

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.6, 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.

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

8.8. 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.

8.9. 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 дальнейших расчетов необходимо использовать величину В— среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить калибровочный график зависимости В(ед.опт. плотн.) от концентрации ССГ в калибровочных пробах (нмоль/л).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

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

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор ИФА-ССГ 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 флакона хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат анти-ССГ-пероксидаза, буфер Д 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);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2..8°C в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, 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, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ССГ 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.

По вопросам качества набора ИФА-ССГ следует обращаться в ЗАО «Алкор Био» по адресу: г. Санкт-Петербург, пос. Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС ФГУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ по адресу: 117246, г.Москва, Научный проезд, д.14А, тел. (095) 120-60-95, 120-60-96.

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 | – | 20 | – | – | – | – | – | – | – |
| КП № 2, мкл | – | – | 20 | – | – | – | – | – | – |
| КП № 3, мкл | – | – | – | 20 | – | – | – | – | – |
| КП № 4, мкл | – | – | – | – | 20 | – | – | – | – |
| КП № 5, мкл | – | – | – | – | – | 20 | – | – | – |
| КП № 6, мкл | – | – | – | – | – | – | 20 | – | – |
| КС, мкл | – | – | – | – | – | – | – | 20 | – |
| С _х , мкл | – | – | – | – | – | – | – | – | 20 |
| Конъюгат анти-ССГ-пероксидаза, мкл | – | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Инкубация № 1 | 1 час, термостатируемый шейкер, +37°C | | | | | | | | |
| 5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл | 5х 300 | 5х 300 | 5х 300 | 5х 300 | 5х 300 | 5х 300 | 5х 300 | 5х 300 | 5х 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;
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция разработана:
 зав.лабораторией биотехнологии ЗАО «Алкор Био» В.А.Головаченко,
 генеральным директором ЗАО «Алкор Био», к.б.н. Д.Г.Полынцевым и
 ст.н.сотрудником НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН, к.м.н. Н.Н. Ткаченко.