«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от «18» ноября 2011 г. № 7488-Пр/11

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **ТЕСТОСТЕРОНА** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(«СтероидИФА-тестостерон»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-тестостерон» предназначен для количественного определения тестостерона в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тестостерон — стероидный гормон с молекулярной массой 288,4 Да. Тестостерон синтезируется главным образом в семенниках, а также, в существенно меньших количествах, в яичниках и коре надпочечников. Уровень тестостерона в крови является важным показателем при оценке функционального состояния семенников, диагностике гирсутизма у женщин и ряда опухолевых заболеваний надпочечников, яичников и семенников.

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

1.3. Набор «СтероидИФА-тестостерон» 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.*

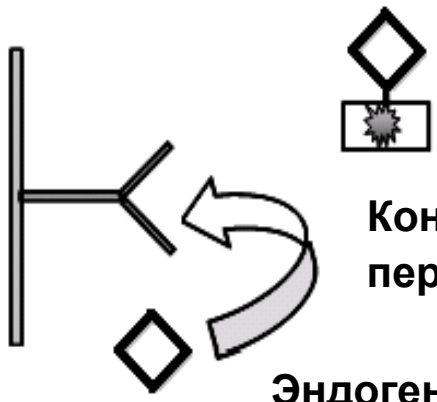
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1.Принцип действия

В наборе «СтероидИФА-тестостерон» использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата тестостерон-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным тестостероном сыворотки крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

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

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



Конъюгат тестостерон-пероксидаза

Планшет с антителами к тестостерону

Эндогенный тестостерон конкурирует с конъюгатом за связывание с антителами

Рисунок 1. Схема анализа

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

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тестостерону, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к тестостерону» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества тестостерона. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций тестостерона в

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

калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 0,5; 1,5; 5; 15; 50 нмоль/л – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 0,5 мл);

- конъюгат тестостерон-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (18 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 тестостерона, 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 тестостерону с другими стероидами приведена в Таблице 1.

Таблица 1

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
Тестостерон	100
5-α-дигидротестостерон	9,8
Андростендиол	2,0
Андростенолон	0,2
Андростандион	1,3
Дегидроэпиандростерон	0,2
Кортизол	0,04
Прогестерон	0,1
Эстрон	0,06
Эстрадиол	0,9
Эстриол	0,02

3.2. Коэффициент вариации результатов определения тестостерона в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «СтероидИФА-тестостерон» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации тестостерона в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в

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

диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» тестостерона — проверка соответствия значения определяемой концентрации тестостерона 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 тестостерона в сыворотке крови человека не превышает 0,2 нмоль/л.

3.6. Диапазон ожидаемых значений. Содержание тестостерона измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 70 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Средняя концентрация тестостерона в сыворотке крови 37 здоровых женщин составила в среднем 1,8 нмоль/л (0,5–4,3 нмоль/л); в сыворотке крови 33 здоровых мужчин — 19,2 нмоль/л (12,1–38,3 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.

Примечание: *в наборе «СтероидИФА-тестостерон» значения концентраций калибровочных проб выражены в*

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

нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл необходимо значение концентрации в нмоль/л умножить на 0,288.

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 (шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при комнатной температуре (+18...25°С);
- 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 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.

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

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 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

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

флаконы при комнатной температуре (+18…25°С) периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,5 мл.

7.1.4. 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.

7.1.5. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

На странице 18 приведена схема проведения анализа.

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;

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

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.*

7.2.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 150 мкл конъюгата.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 1,5 часов при встряхивании на **шейкере при комнатной температуре (+18…25°С) 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 четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по **п. 7.1.4.**, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить

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

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°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

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

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 комнатной температуре.

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.*

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

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 тестостерона в калибровочных пробах (нмоль/л) (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 оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

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

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

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

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 тестостерона в пробах по калибровочному графику.



Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

9.3. Для образцов сыворотки крови со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора (B_1) принимать значение концентрации «ниже 0,2 нмоль/л».

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

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации тестостерона, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «СтероидИФА-тестостерон» 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 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 и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;

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

- 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 тестостерона 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, входящих в состав данного набора реагентов.

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

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		***150 мкл*** конъюгата			
4	**Инкубация**	—	**КТ**	90’	**Шейкер**, 500-800 об/мин
5	Промывка	***300 мкл*** в лунку **1*промывочного раствора** (4 раза)			**1***промывочный раствор= =14 мл буфера Р + 266 мл H_2O
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°С);
ПО — программное обеспечение

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

По вопросам качества набора «СтероидИФА-тестостерон» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А; тел/факс: (812) 677-8779.

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