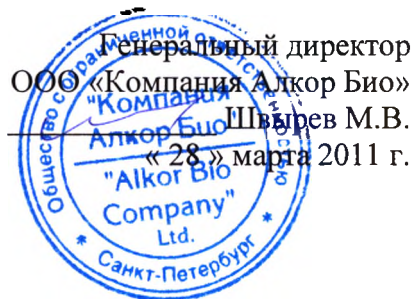


«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора  
от «\_\_» \_\_\_\_ 20\_\_ г. № \_\_\_\_\_



**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 молекулярным весом 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.

**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).

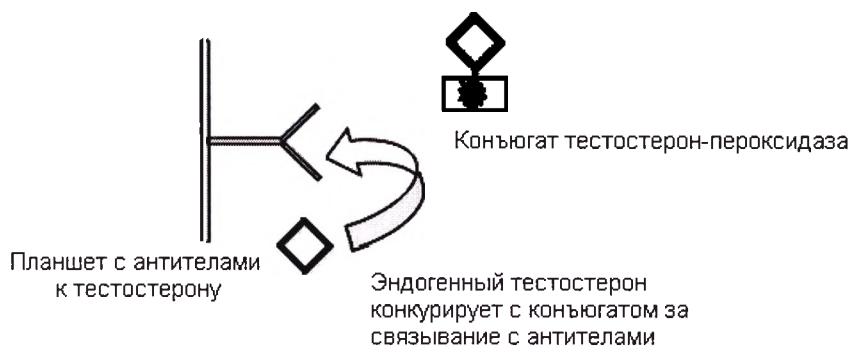
***Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

**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 антитела-ми конъюгата обратно пропорционально количеству тестостерона в исследуемом образце (Рисунок 1).



**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 калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 0,5; 1,5; 5; 15; 50 нмоль/л – 6 флаконов (лиофилизированные 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 (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

### 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- $\alpha$ -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 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 нмоль/л. Для пересчета концентраций тестостерона 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 требования 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.

## 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°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 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 стустка 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  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  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 ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) 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 лиофилизированных 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 флаконы при комнатной температуре, 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.

В Приложении 1 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;                 |
| 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°C) 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 раз а. При каждой промывке во все лунки добавить 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 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 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.*

## 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 A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

**Примечание:** среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 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 A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

$$B/B_1 \times 100\%, \quad (1)$$

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

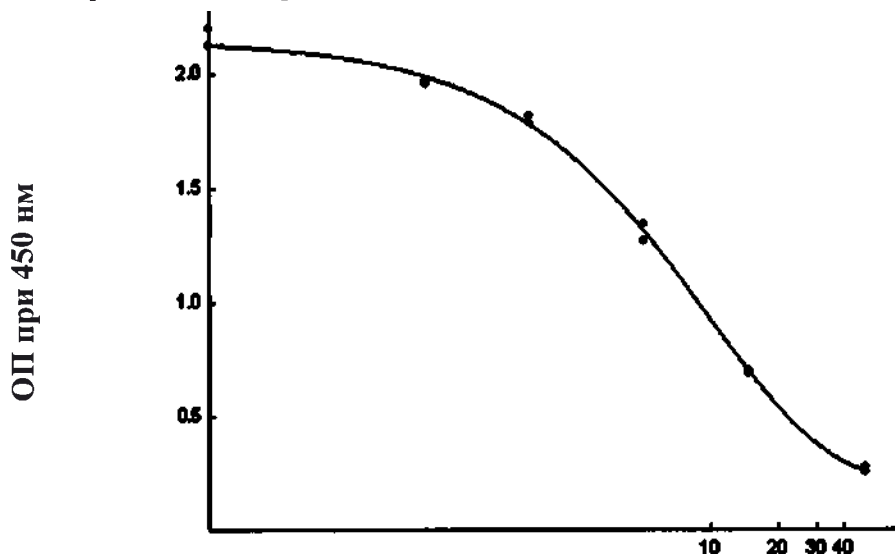
$B_1$  – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то использовать формулу:

$$(B - B_T) / (B_1 - B_T) \times 100\%, \quad (2)$$

где  $B_T$  – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.

9.2. Определить содержание тестостерона в пробах по калибровочному графику.



Log концентрации тестостерона, нмоль/л

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».

**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  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  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  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  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, входящего в состав данного набора реагентов.

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

**10.7.** К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

**10.8.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

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

Генеральный директор  
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем  
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической  
лабораторной диагностики ГОУ ДПО  
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

« 10 » Июль 2011 г.



# СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

## Приложение 1

| №  | Стадия (операция)               | Реагенты                                               | Темпера-<br>тура      | Время                                                      | Примечания                                                       |
|----|---------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов              | 50 мкл КП и КС                                         | КТ<br>+18<br>...+25°C | Внесение КП, КС<br>и исследуемых<br>образцов не более 15'  | В лунки для определения ОП<br>ТМБ ничего не вносить              |
| 2  |                                 | 50 мкл исследуемых образцов                            |                       |                                                            |                                                                  |
| 3  |                                 | 150 мкл конъюгата                                      |                       |                                                            |                                                                  |
| 4  | Инкубация                       | —                                                      | КТ                    | 90'                                                        | Шейкер,<br>500-800об/мин                                         |
| 5  | Промывка                        | 300 мкл в лунку<br>1*промывочного раствора<br>(4 раза) |                       |                                                            | 1*промывочный раствор<br>=14 мл буфера Р+266 мл Н <sub>2</sub> О |
| 6  | Внесение хромогена              | 100 мкл ТМБ                                            |                       |                                                            |                                                                  |
| 7  | Инкубация с ТМБ                 | —                                                      | КТ                    | 15 - 30'                                                   | В темноте                                                        |
| 8  | Остановка ферментной<br>реакции | 100 мкл стоп-реагента                                  |                       |                                                            |                                                                  |
| 9  | Перемешивание                   |                                                        | КТ                    | 1 - 2'                                                     | Шейкер                                                           |
| 10 | Регистрация<br>результатов      | —                                                      |                       | В течение 20' после оста-<br>новки ферментной реак-<br>ции | Фотометр, 450 нм                                                 |
| 11 | Обработка<br>результатов        |                                                        |                       |                                                            | Калькулятор и масштабная<br>бумага/соответствующее ПО            |

**Примечания:** КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C); ПО — программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено  
печатью 10 ( десять ) лист 10

Генеральный директор  
ООО «Компания Алкор Био»  
М.В. Швырев

