

«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 антителами конъюгата обратно пропорционально количеству тестостерона в исследуемом образце (Рисунок 1).

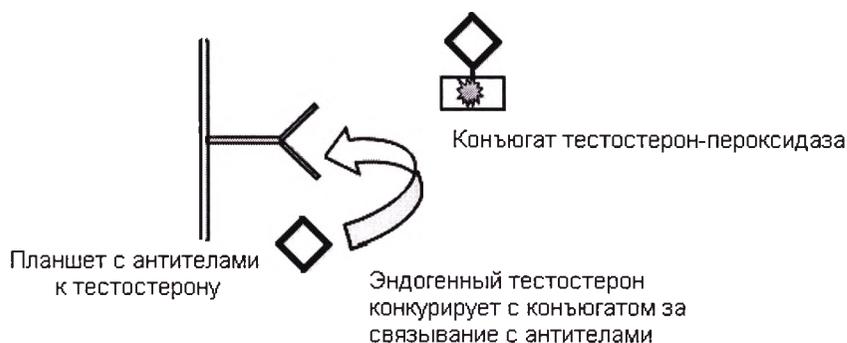


Рисунок 1. Схема анализа

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 восьмилучных 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- 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 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 N 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 стутка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолированную 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°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:

$$V/V_1 \times 100\%, \quad (1)$$

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

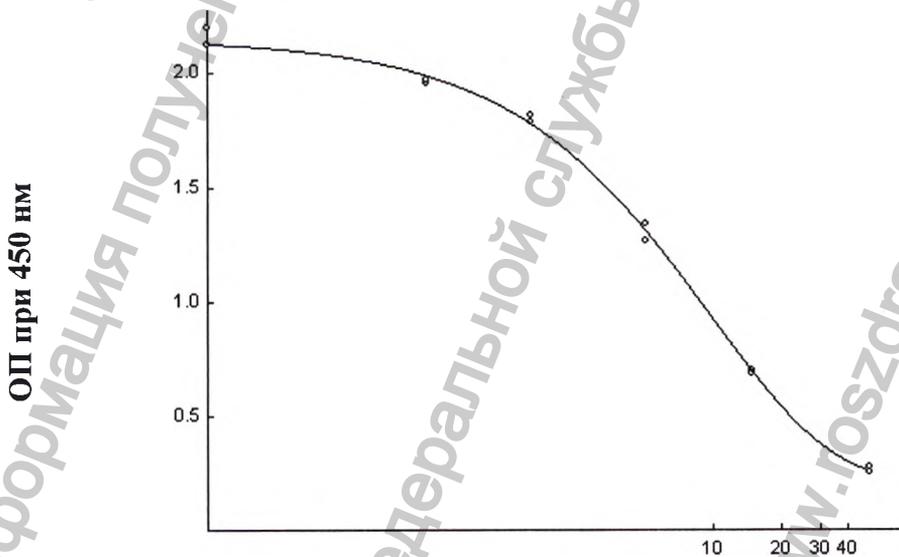
V_1 – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1.

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

$$(V - V_T) / (V_1 - V_T) \times 100\%, \quad (2)$$

где V_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 (V_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.
«17» Июль 2011 г.



Информация получена с официального сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.gosdramnadzor.gov.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	50 мкл КП и КС	КТ +18 ...+25°C	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, 500-800об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор =14 мл буфера Р+266 мл H ₂ O
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°C); ПО — программное обеспечение.

Информация получена с официального сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.goszdravnadzor.gov.ru

Пронито, пронумеровано, скреплено
печатью (19.05.2018) лист 18

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

