

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение
«Диагностические системы»
И. Е. Колосов
«28» августа 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ по применению

набора реагентов для количественного определения тестостерона методом иммуноферментного анализа (ДС-ИФА-Стероид-Тестостерон)

1. Назначение

1.1. Набор реагентов ДС-ИФА-Стероид-Тестостерон предназначен для количественного определения содержания тестостерона в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Тестостерон – стероидный гормон с молекулярной массой 288,4 Да, является одним из наиболее важных гормонов мужчин. Тестостерон ответственен за развитие мужских половых органов и вторичных половых признаков. Основным местом образования тестостерона является интерстициальная ткань семенников. У женщин тестостерон синтезируется в надпочечниках и яичниках. Секреция тестостерона подчиняется суточному ритму – максимальная концентрация тестостерона в 6 ч утра, минимальная – в 20 ч. У женщин продукция тестостерона зависит от фазы менструального цикла: максимальное количество наблюдается в лютеиновой фазе и в период овуляции. Количественное определение уровня тестостерона в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния семенников, диагностике гирсутизма у женщин и некоторых опухолевых заболеваний надпочечников, яичников и семенников.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 48 проб (40 неизвестных проб, шесть калибровочных проб, одна проба контрольной сыворотки, одна проба для определения оптической плотности ТМБ - Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке; набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата тестостерон-пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного тестостерона и тестостерона, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к тестостерону, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами тестостерона и конъюгата тестостерон-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально концентрации тестостерона в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата тестостерон-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация тестостерона в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора:

– иммуносорбент – полистироловый 96-луночный разборный планшет (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тестостерону, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

– конъюгат - тестостерон, меченный пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12 мл);

– 6 калибровочных проб на основе сыворотки крови человека, содержащих известные количества тестостерона: 0 нмоль/л; 0,5 нмоль/л; 5 нмоль/л; 10 нмоль/л; 20 нмоль/л и 40 нмоль/л; концентрации тестостерона в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетке флакона и в паспорте на набор – 6 фл. (по 0,5 мл);

– контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием тестостерона, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (0,5 мл);

– промывочный раствор, 25-кратный концентрат, маркирован «ПР» – 1 фл. (50 мл);

– ТМБ-Субстратный раствор - 1 фл. (12 мл);

– стоп-реагент (0,2 М серная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 фл. (15 мл);

– бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

– крышка к полистироловым 96-луночным разборным планшетами;

– одноразовые наконечники к полуавтоматическим пипеткам;

– пластиковая ванночка для реагентов;

– пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация тестостерона в сыворотке крови человека не превышает 0,2 нмоль/л.

3.2. Специфичность. Величины перекрестных реакций с родственными соединениями приведены в таблице.

Таблица

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
тестостерон	100
тестостерон	0,056
кортизол	0,004
эстрадиол	0,005
дигидротестостерон	4,8
андростендион	3,6
андростерон	0,048
кортизон	0,004
эстриол	0,002
эстрон	0,007

3.3. Коэффициент вариации результатов определения тестостерона в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации тестостерона в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой 0 нмоль/л имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,5 - 40 нмоль/л и составляет $\pm 10\%$.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» тестостерона - соответствие измеренной концентрации тестостерона предписанной в пробе, полученной смешением равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5 нмоль/л. Процент открытия составляет 90 - 110%.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию тестостерона измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 150 здоровых людей в возрасте от 21 до 45 лет. Средняя концентрация тестостерона в сыворотке крови 95 здоровых мужчин составила 19,0 нмоль/л (от 6,4 до 31,6 нмоль/л), 55 здоровых женщин составила 2,3 нмоль/л (от 0,2 до 4,4 нмоль/л).

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций тестостерона, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента лиц.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. 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.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной 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.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. кровь человека является потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель 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, необходимые при работе с набором:

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

– термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание планшета при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ со скоростью от 500 до 800 об/мин;

– устройство для промывания планшета;

– дозаторы пипеточные 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;

– дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

– цилиндры мерные вместимостью 200 мл и 500 мл;

– стакан стеклянный вместимостью 500 мл;

– вода дистиллированная;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– перчатки резиновые или пластиковые.

6. Подготовка исследуемых образцов сывороток крови человека.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов сыворотки крови с добавлением азидата натрия в качестве консерванта! Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2 - 8 °С не более 3 суток или при

температуре минус 20 °С и ниже не более 3 месяцев (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией анализировать нельзя! Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 минут при температуре 2 - 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре (18 - 25 °С) в течение времени не менее 30 минут.

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (18 - 25 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и переставить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в тщательно герметизированный пакет и хранить при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл дистиллированной воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Конъюгат, калибровочные пробы, контрольная сыворотка, ТМБ-Субстратный раствор и стоп-реагент готовы к применению.

8. Проведение анализа.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно

перемешаны и доведены до комнатной температуры.

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

A1, A2 - № 1 для измерения величины оптической плотности (ОП) калибровочной пробы 0 нмоль/л;

B1, B2 – № 2 для измерения величины ОП калибровочной пробы 0,5 нмоль/л;

C1, C2 - № 3 для измерения величины ОП калибровочной пробы 5 нмоль/л;

D1, D2 - № 4 для измерения величины ОП калибровочной пробы 10 нмоль/л;

E1, E2, - № 5 для измерения величины ОП калибровочной пробы 20 нмоль/л;

F1, F2 - № 6 для измерения величины ОП калибровочной пробы 40 нмоль/л;

G1, G2 - № 7 для измерения величины ОП контрольной сыворотки;

H1, H2 - № 8 для измерения величины ОП раствора ТМБ-Субстратного раствора.

Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в остальные лунки – по 25 мкл исследуемых сывороток крови в дубликатах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

8.3. Во все лунки планшета, кроме H1 и H2, внести по 100 мкл конъюгата, закрыть планшет крышкой и инкубировать на шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 30 минут при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР (см. п. 7.3), добавляя во все лунки планшета по 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью

промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ-Субстратный раствора и инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (18 – 25 °С) в течение 20 – 30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.6. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ-Субстратный раствор, по 150 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и встряхнуть планшет на шейкере в течение 30 секунд.

9. Регистрация результатов

Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм.

Если по техническим причинам невозможно измерить ОП растворов в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.6., следует иметь в виду, что окраска раствора в лунках планшета стабильна в течение времени не более 20 минут при комнатной температуре (18 – 25 °С).

10. Учет результатов

Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках Н1 и Н2 из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать формулу $V/V_0 \cdot 100\%$ для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V – среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. Если программа фотометра не позволяет вычитать величину ОП в лунках Н1 и Н2, то необходимо пользоваться формулой $(V - V_T)/(V_0 - V_T) \cdot 100\%$, где V_T – среднее арифметическое значение величины ОП в лунках Н1 и Н2.

Построить в координатах «logit-log» калибровочный график зависимости V/V_0 в процентах от концентрации тестостерона в калибровочных пробах (нмоль/л). Определить содержание тестостерона в исследуемых пробах по калибровочному графику.

Определение концентрации тестостерона в контрольной сыворотке необходимо для проверки точности и достоверности полученных результатов. В том случае, когда полученное значение концентрации в контрольной сыворотке находится в пределах концентраций, указанных на этикетке флакона с контрольной сывороткой, полученные при анализе исследуемых проб результаты являются достоверными.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов ДС-ИФА-Стероид-Тестостерон должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности (13 месяцев). Допускается хранение наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут.

11.2. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

– Иммуносорбент - оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в герметично закрытый пакет и хранить при температуре 2 - 8 °С не более 1 месяца;

– ПР, 25-кратный концентрат и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытом виде при температуре 2 - 8 °С в течение срока годности набора;

– Рабочий ПР, подготовленный к использованию, хранить при температуре 2 - 8 °С не более 3 суток;

– Конъюгат, калибровочные пробы, контрольную сыворотку и ТМБ-Субстратный раствор после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытом виде при температуре 2 - 8 °С не более 1 месяца.

11.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое

соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам качества набора ДС-ИФА-Стероид-Тестостерон следует обращаться в ООО «НПО «Диагностические системы» по адресу 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300.

E-mail: info@npods.nnov.ru; www.npods.ru.

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП «Росздравнадзора» по адресу: 117051, г. Москва, Научный пр-д, 14А, тел.(499)120-60-95,120-60-96.

Директор по производству ООО

«Научно-производственное объединение

«Диагностические системы», к.б.н.



В. К. Пименов

Заместитель директора по научной работе

ФГУН НИИИГП Роспотребнадзора



М.В. Кувшинов