

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля качества,  
эффективности, безопасности лекарственных  
средств и медицинской техники МЗ РФ  
\_\_\_\_\_ Р.У. Хабриев  
«26» декабря 2000 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**ТЕСТОСТЕРОНА**  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
**(СтероидИФА-тестостерон-01)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа Комитета  
по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 9 от 23 октября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,  
УТВЕРЖДЕННОЙ 18 июня 1996 г.

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «СтероидИФА-тестостерон-01» предназначен для количественного определения концентрации 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.

**1.3.** Набор «СтероидИФА-тестостерон-01» 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.

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

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата тестостерон-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным тестостероном сыворотки крови за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами тестостерона и конъюгата тестостерон-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству тестостерона в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с раствором ТМБ 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 определяемых образцах.

## **3. 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 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества тестостерона; значения концентраций тестостерона в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат тестостерон-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием тестостерона, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5мл).

#### 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к тестостерону с другими стероидами приведена в таблице.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения тестостерона в одном и том же образце с использованием набора «СтероидИФА-тестостерон-01» не превышает 8%.

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

Таблица

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
Тестостерон	100
5-альфа-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

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» тестостерона — соответствие измеренной концентрации тестостерона 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 тестостерона в сыворотке крови человека не превышает 0,2 нмоль/л.

4.6. Клиническая проверка. 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 (<0,2–4,3 нмоль/л); в сыворотке крови 33 здоровых мужчин — 19,2 нмоль/л (12,1–38,3 нмоль/л).

**4.7.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций тестостерона, 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 и производные 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 стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при комнатной температуре (+18...25°C);
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндры мерные, позволяющие отмерять 200 мл;
- стаканы стеклянные вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

### 7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть пробки. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C). 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.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2. Стрипы.** Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 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.

**7.3. 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.

**7.4. Конъюгат тестостерон-пероксидаза** готов к использованию.

**7.5. Раствор ТМБ** готов к использованию.

**7.6. 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 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**8.4.** Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 150 мкл конъюгата тестостерон-пероксидаза.

**8.5.** Инкубировать стрипы в течение 1,5 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере со скоростью 500–800 об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. 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 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) 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 тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 мин.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

**8.10.** Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу  $V/V_0 \times 100\%$  для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где  $V$  — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,  $V_0$  — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу «0 нмоль/л».

В координатах «logit-log» построить для калибровочных проб график зависимости  $V/V_0 \times 100\%$  от концентрации тестостерона в калибровочных пробах (нмоль/л).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой  $(V - V_T) / (V_0 - V_T) \times 100\%$ , где  $V_T$  — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание тестостерона в пробах по калибровочному графику.

**8.11.** 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 **20 минут** при температуре +2...8°C.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**9.1.** Набор «СтероидИФА-тестостерон-01» 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 в течение всего срока годности при температуре +2...8°C;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат тестостерон-пероксидаза 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 в течение всего срока годности при температуре +2...8°C.

**9.2.** Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.3. При вскрытии и растворении лиофилизованных компонентов необходимо следить, чтобы на крышках и стенках флаконов не осталось сухого вещества.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

· количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;

· для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации тестостерона 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 «СтероидИФА-тестостерон-01» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, телефон/факс: (812) 596-76-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14А, телефон: (095) 120-60-95.**

### 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	—	50	—	—	—	—	—	—	—
КП № 2, мкл	—	—	50	—	—	—	—	—	—
КП № 3, мкл	—	—	—	50	—	—	—	—	—
КП № 4, мкл	—	—	—	—	50	—	—	—	—
КП № 5, мкл	—	—	—	—	—	50	—	—	—
КП № 6, мкл	—	—	—	—	—	—	50	—	—
КС, мкл	—	—	—	—	—	—	—	50	—
С <sub>х</sub> , мкл	—	—	—	—	—	—	—	—	50
Конъюгат тестостерон-пероксидаза, мкл	—	150	150	150	150	150	150	150	150
Инкубация № 1	1,5 часа, шейкер, КТ								
4-кратная промывка:	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х
промывочный буфер, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 мин								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 мин								
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<sub>х</sub> — анализируемые пробы;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция составлена:

В.А. Головаченко, зав. лабораторией биотехнологий ЗАО «Алкор Био»;

Д.Г. Польшинцевым, ген. директором ЗАО «Алкор Био»;

Н.Н. Ткаченко, сотрудником НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН.

