«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«03» января 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного определения концентрации тестостерона в сыворотке крови
(Тестостерон – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Тестостерон-ИФА-БЕСТ предназначен для определения концентрации тестостерона в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тестостерон – стероидный гормон с молекулярным весом 288,4 Да, синтезируется главным образом в семенниках, в значительно меньшем количестве синтезируется яичниками и корой надпочечников.

1.3. Количественное определение уровня тестостерона в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования эндокринной системы, в частности, при синдроме Клейнфельтера, гипопитуитризме, гипо- и гипергонадизме, гирсутизме и ряде опухолевых заболеваний семенников, яичников и надпочечников.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных, 1 контрольного образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата происходит конкурентное связывание сывороточного тестостерона и тестостерона, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к тестостерону, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окрашивания обратно пропорциональна концентрации тестостерона в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках концентрация тестостерона рассчитывается на основании калибровочного графика в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тестостерону, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта «Lyphochek Immunoassay Plus Control Testosterone» (фирма BioRad, США), содержащие известные количества тестостерона – 0; 1; 3; 10; 30 и 60 нмоль/л; концентрации тестостерона в калибровочных образцах могут отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,3 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием тестостерона, готовый для использования – 1 флакон (0,3 мл);
- конъюгат тестостерона с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

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

Набор дополнительно комплектуется:
- пленкой для заклеивания планшета – 1 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5 – 200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к тестостерону с другими стероидами составляет: с 5-а-дигидротестостероном – 100%; с андростендионом – 2,1%; с дегидроэпиандростероном – 1,6%, с эпитестостероном – 2%.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания тестостерона в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора Тестостерон-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации тестостерона в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей тестостерон, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1–60 нмоль/л и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации тестостерона предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 3 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация тестостерона не превышает 0,2 нмоль/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация тестостерона, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 110 здоровых мужчин в возрасте 20–50 лет, находилась в пределах от 4,5 до 35,4 нмоль/л; у 85 здоровых женщин концентрация тестостерона не превышала 3,1 нмоль/л.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации тестостерона, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражаю-щим действием. 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.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

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

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при 400–800 об/мин и температуре (37±1)°С;
– холодильник бытовой;
– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5–5000 мкл;
– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50, 100 и 350 мкл;
– промывочное устройство для планшетов;
– флаконы вместимостью 10–15 мл;
– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
– колба вместимостью 1000 мл;
– вода дистиллированная;
– перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 24 ч или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25°С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. *Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.*

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные образцы и контрольный образец готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Калибровочные и контрольный образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°С в течение 1 месяца.

7.5. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

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

Необходимое количество конъюгата отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Конъюгат после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°С в течение 1 месяца.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл каждого калибровочного образца и по 20 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15 мин.

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл коньюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при 650 об/мин и температуре (37 ± 1)°С.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5.

Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при 650 об/мин и температуре (37 ± 1)°С.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм – 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации тестостерона в калибровочных образцах (нмоль/л).

9.2. Определить содержание тестостерона в контрольном образце и в анализируемых образцах по калибровочному графику.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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

10.2. Набор реагентов «Тестостерон-ИФА-БЕСТ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25°С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в пределах срока годности.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности;
- калибровочные образцы, контрольный образец, конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение 1 месяца;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации тестостерона в контрольном образце.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 24 ч или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора
«Тестостерон-ИФА-БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 363-20-60,
тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации тестостерона в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7. настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

3. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 > ОП_1 > ОП_3 > ОП_{10} > ОП_{30} > ОП_{60}$;

– $ОП_0 \geq 1{,}0$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– вычисленное по калибровочному графику значение концентрации тестостерона в контроль-

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

ном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.
$ОП_0$, $ОП_1$, $ОП_3$, $ОП_{10}$, $ОП_{30}$ и $ОП_{60}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 1, 3, 10, 30 и 60 нмоль/л соответственно.

5. Расчет результатов анализа

Для построения калибровочного графика на прилагаемом трафарете против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Определить концентрацию тестостерона в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации тестостерона в образце

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:

нормальные концентрации тестостерона:

- **мужчины** – 4,5–35,4 нмоль/л;
- **женщины** – 0–3,1 нмоль/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации тестостерона, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

6. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Тестостерон-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Внести:	по 20 мкл калибровочных образцов и контрольного образца в дублях;
	по 20 мкл анализируемых образцов.
Внести:	по 100 мкл конъюгата.
Инкубировать:	60 мин, 37°С, 650 об/мин.
Промыть:	промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
Внести:	по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
Инкубировать:	15 мин, 37°С, 650 об/мин, в темноте.
Внести:	по 100 мкл стоп-реагента.
Измерить:	ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

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

7. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до …		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-23-77.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл	Промывочный раствор	
			Концентрат ФСБ-Т, мл	Дистил. вода, мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

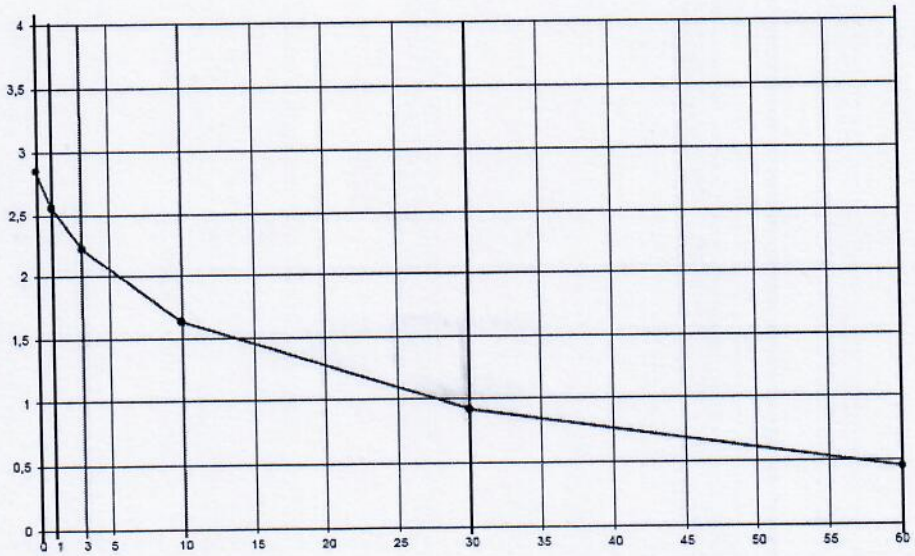


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации тестостерона в калибровочных образцах

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