

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов
_____ 2011 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, гипопитуитаризме, 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

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной.

10

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, готовая 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).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 1 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5 – 200 мкл – 16 шт.;
- графариетом 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 путём смешивания равных объёмов 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 юго-восточного региона Западной Сибири 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 раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый 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 приём 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:

- 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 $(37 \pm 1) ^\circ C$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 50, 100 и 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные 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.

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

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 мес.

7.5. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный 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 мес.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в стеклянный 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.

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 конъюгата (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 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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 жёлтый 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. УЧЁТ 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.

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 не позднее 1 мес. с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но 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 мес;

– 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 надёжных 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 ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «Тестостерон-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «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

Зав. лабораторией НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России

д.м.н., профессор В.В. Долгов
«07» 02 2012 г.



Информация получена с официального сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения



Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью
девять листов

А. Сергеева Е.А.