

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

« 27 »

апреля

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения свободного тестостерона в сыворотке (плазме) крови «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения свободного тестостерона в сыворотке (плазме) крови «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации свободного тестостерона в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тестостерон – стероид с молекулярной массой 288.4 Да. Основным местом образования тестостерона в семенниках являются клетки Лейдига (интерстициальная ткань). У женщин тестостерон синтезируется в надпочечниках, а контроль за его продукцией осуществляет лютеинизирующий гормон. Тестостерон стимулирует развитие мужских половых органов и вторичных половых признаков. Секреция тестостерона имеет определенный циркадный ритм. Наивысший уровень гормона отмечается в 6 часов утра, наименьший – в 20 часов. У женщин продукция тестостерона зависит от фазы менструального цикла: максимальное образование гормона происходит в лютеиновой фазе и в период овуляции. Тестостерон свободный (Свободный тестостерон, Free testosterone) представляет собой фракцию тестостерона сыворотки крови не находящимся в комплексе ни с глобулином, связывающим половые гормоны (SHBG), ни с альбумином. Свободный тестостерон в количественном отношении составляет 2 – 3% от общего тестостерона. Биологически активным является только тестостерон свободный и связанный с альбумином («биологически доступный тестостерон»). Уровень «биологически доступного тестостерона» отражает количество функционально активного тестостерона в организме.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение свободного тестостерона в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики дисфункций половых желез различной этиологии, при оценке функционального состояния семенников, диагностике гирсутизма у женщин и ряда опухолевых заболеваний надпочечников, яичников и семенников.

1.4. Набор предназначен для диагностики *ин витро*.

1.5. Область применения – клиническая лабораторная диагностика. Потенциальным потребителем является медицинский персонал клинико-диагностических лабораторий.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

2.2. Состав Набора:

- **Планшет** 96-луночный полистироловый стрипированный, готов к использованию - 1 шт.;
- **Калибровочные пробы**, содержащие известные количества свободного тестостерона – **C1, C2, C3, C4, C5, C6**; концентрации свободного тестостерона в калибровочных пробах указаны в аналитическом паспорте и на этикетках пробирок (флаконов), готовы к использованию - 6 флаконов (0,8 мл каждая);
- **Конъюгат**, готов к использованию - 1 флакон (14 мл);
- **Контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием свободного тестостерона, готова к использованию - 1 флакон (0,8 мл);
- **Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ)**, готов к использованию - 1 флакон (14 мл);
- **Концентрат отмывочного раствора** - 1 флакон (22 мл);
- **Стоп-реагент**, готов к использованию - 1 флакон (14 мл);
- **Бумага** для заклеивания планшет, готова к использованию - 2 шт.
- **Аналитический паспорт**;
- **Инструкция по применению Набора.**

2.3. Принцип работы Набора. Определение свободного тестостерона основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы антитела к свободному тестостерону. Свободный тестостерон из образца конкурирует с конъюгированным тестостероном за связывание с антителами на поверхности лунок. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с субстратным раствором тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации свободного тестостерона в исследуемом образце. Концентрацию свободного тестостерона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания свободного тестостерона в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция свободного тестостерона с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
5-альфа-дегидротестостерон	16
Андростендиол	1.0
Андростендион	0.4
Андростерон	<0.1
Дегидроэпиандростерон	<0.1
Прогестерон	<0.1
Эстрадиол, эстриол	<0.01
Кортизол, прегненолон	<0.01

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания свободного тестостерона в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации свободного тестостерона в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей свободного тестостерона, имеет линейный характер в диапазоне концентраций С2-С6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного тестостерона - соответствие измеренной концентрации свободного тестостерона предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы С3. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором концентрация свободного тестостерона не более 0,06 пг/мл.

3.6. Интерсепт - значения концентраций свободного тестостерона (пг/мл), при которых соотношение В/В_{С6} соответствует 20%, 50% и 75% . Пределы, указаны в аналитическом паспорте.

3.7. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы	
	пг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	4,5	42
Женщины	-	4,1
Женщины постменопауза	0,1	4,7

В соответствии с требованиями **GLP** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» уточнить значения концентрации свободного тестостерона, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

3.8. Интерференция.

Изучение образцов плазмы с различными антикоагулянтами показало, что такие антикоагулянты как ЭДТА, гепарин и цитрат натрия не приводят к матричному эффекту.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2б.

4.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении контрольной сыворотки, инактивированы и не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ 1, 2 антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1.

4.3. Набор предназначен только для профессионального использования.

4.4. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием.

Необходимо избегать контакта субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ) и концентрата отмывочного раствора с кожей и слизистыми. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с Набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток), так как образцы сыворотки или плазмы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.

4.6. Все промывные растворы следует собирать в специальный контейнер и обрабатывать дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке.

4.7. Лабораторную посуду многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать с

использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.

4.8. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70% раствором этилового спирта.

4.9. Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

4.10. При работе следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905 (ISO 15190:2003) «Лаборатории медицинские Требования безопасности».

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

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **термостат**, поддерживающий температуру $+37\pm 3^{\circ}\text{C}$;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;
- **цилиндр мерный** вместимостью 1000 мл;
- **вода дистиллированная**;
- **перчатки резиновые** или пластиковые;
- **бумага фильтровальная**.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

6.1. Процедура получения анализируемого материала. Сбор образцов крови человека проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведённую сыворотку (плазму) крови человека.

6.1.1. Подготовка анализируемых образцов сывороток крови пациентов. Кровь отобрать венопункцией, дать полностью свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Для анализа использовать неразведённую сыворотку (плазму) крови человека.

6.1.2. Приготовление анализируемых образцов плазмы. Сбор крови производить в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянты и немедленно после сбора центрифугировать. В качестве антикоагулянтов использовать ЭДТА, гепарин и цитрат натрия.

Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка.

6.2. Образцы сыворотки или плазмы крови хранить при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ холодильных камер или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры не более 3 суток. Предпочтительно исследование образцов, хранящихся не более 24 часов при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$.

6.3. Допустимо замораживание образцов для более длительного хранения (до температуры -20°C и ниже) не более 2 недель. Допускается однократное размораживание образцов.

6.4. Перед проведением исследования образца, подвергнутого замораживанию, его следует тщательно перемешать и осветлить с помощью центрифугирования.

6.5. Образцы сыворотки (плазмы), содержащие агрегаты и осадок, осветлять с помощью центрифугирования.

6.6. Образцы с гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом исследованию не подлежат, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.7. Перед проведением анализа исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего раствора необходимое количество отмывочного раствора отобрать в отдельную емкость и добавить соответствующее количество дистиллированной воды (кратность разведения указана на этикетке флакона). Полученный раствор тщательно перемешать.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 15 мин.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

8.3. Заклеить планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 120 минут при температуре 37°C .

8.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и отмыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки планшета по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3 мин.

Инкубировать планшеты в темноте при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

8.6. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8.7. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение времени не более 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс – десятичный логарифм концентрации свободного тестостерона в калибровочных пробах (пг/мл), ось ординат – оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание свободного тестостерона в исследуемых образцах. Если используемый образец предразводили, умножить полученный результат на фактор разведения.

10. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

10.1. При использовании Набора реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение свободного тестостерона в контрольной сыворотке.

10.2. Набор реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) этого изделия.

11.1. Транспортирование.

11.1.1. Транспортирование Набора реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре $(+2-8)^{\circ}\text{C}$.

11.1.2. Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения "Холодовой цепи", обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

11.1.3. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.2. Хранение.

11.2.1. Набор реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (18 мес.).

11.2.2. Не допускается замораживание целого Набора.

11.2.3. Хранение изделий при температуре от $+2-8^{\circ}\text{C}$ должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

11.2.4. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

- конъюгат, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8°C не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20°C в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25°C) не более 5 сут. или при температуре +2-8°C не более 30 сут;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре +2-8°C в течение всего срока годности Набора.

11.2.5. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11.3. Эксплуатация.

11.3.1. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- Не использовать Набор реагентов, если упаковка повреждена.
- Тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.
- Использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой.

- Использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
- Исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования.

- Не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении иммуноферментного анализа.

- Не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат отмывочного раствора, стоп-реагента, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ)).

11.3.2. Все компоненты Набора реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА» при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Не используйте Набор с истекшим сроком годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

11.3.3. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры постановки анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

11.4. Утилизация.

11.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

11.4.2. Медицинские отходы класса Б. Утилизацию или уничтожение наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

11.4.3. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «свТЕСТОСТЕРОН-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 510-57-07.

Заместитель генерального директора
по технологии ООО «ХЕМА»
«27» апреля 2017 г.

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
« 28 » 04 2017 г.



Кострикина Е.С.



Варнавичус П.К.

Символ	Значение символа
	Производитель
	Дата производства
	Номер по каталогу
	Номер серии
	Использовать до (год-месяц)
	Ограничения температуры
	Только для <i>ин vitro</i> диагностики
	Внимание!
	Обратитесь к инструкции по применению
	Беречь от влаги
	Не допускать воздействия солнечного света
	В состав, входят вещества «раздражающие», не являются едкими.
	Планшет
	Калибровочные пробы
	Контрольная сыворотка
	Конъюгат
	Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ)
	Концентрат отмывочного раствора
	Стоп-реагент

ПРОШИТО

В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю.С. Лебедин



ПРОШИТО

В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

«01» 06 2017 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

