

ВЕКТОР



Набор реагентов  
для иммуноферментного определения  
концентрации тестостерона  
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

**Тестостерон – ИФА – БЕСТ**

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**X-3972**





## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов «Тестостерон – ИФА – БЕСТ» предназначен для иммуноферментного количественного определения концентрации тестостерона в сыворотке крови человека.

Набор рассчитан на проведение анализа 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и одного контрольного образца в дублях при одновременном использовании всех стрипов планшета.

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

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

## **2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

### **2.1. Принцип метода**

Метод определения основан на одностадийном твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител к тестостерону.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата происходит конку-

рентное связывание сывороточного тестостерона и тестостерона, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к тестостерону, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Количество связавшегося конъюгата выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации тестостерона в анализируемом образце.

## 2.2. Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к тестостерону, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества тестостерона 0; 1; 3; 10; 30 и 60 нмоль/л<sup>1</sup>, готовые для использования – 6 фл. по 0,3 мл;
- контрольный образец с известным содержанием тестостерона, готовый для использования – 1 фл., 0,3 мл;
- конъюгат тестостерона с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;

---

<sup>1</sup> Концентрации тестостерона в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов.

- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.

### 2.3. Аналитические характеристики

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

| Стероид                | Перекрестная реакция, % |
|------------------------|-------------------------|
| Тестостерон            | 100                     |
| 5-а-дигидротестостерон | 100                     |
| Андростендион          | 2,1                     |
| Дегидроэпиандростерон  | 1,6                     |
| Эпитестостерон         | 2,0                     |

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

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

### **3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

#### **3.1. Обеспечение безопасности персонала**

Обращение с компонентами набора

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 пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.*

Обращение с исследуемыми образцами

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 января 1991 г.

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 3.2. 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).

### **3.2. Обеспечение получения правильных результатов анализа**

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТР51609-2000).

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

– 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 (перекись водорода, дioxлор, хлорамин), в помещениях, где проводят ИФА, приводит к серьезному искажению результатов;

– 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 ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с ТМБ;

– 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. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 650 об/мин, поддерживающий температуру  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;

- дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- промыватель ручной или автоматический;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- фильтровальная бумага;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- пластмассовые ванночки для работы с многоканальными пипетками или чашки Петри;
- вода дистиллированная.

## **5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

На один анализ потребуется 20 мкл сыворотки крови человека.

### **Требования к образцам**

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

Срок хранения образцов – не более 24 ч при 2–8°C. При необходимости образцы можно хранить при минус 20°C в течение 3 месяцев. После размораживания их тщательно перемешивают, осадок отделяют центрифугированием. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием

при 1000–1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18–25°C.

## **6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

При детальном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C течение всего срока годности набора.

Калибровочные и контрольный образцы, конъюгат, раствор тетраметилбензидаина и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

### **6.1. Подготовка планшета**

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

*Хранение:* при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

## **6.2. Приготовление промывочного раствора**

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

## **6.3. Подготовка конъюгата**

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

## **6.4. Подготовка раствора тетраметилбензидина**

Раствор ТМБ готов к использованию. Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина. Непосредственно перед использованием отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходи-

**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           |

мое количество раствора ТМБ в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов).

Утилизировать раствор тетраметил-бензидина, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА (**не сливать во флакон с исходным раствором**).

**Внимание!** Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением

*синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА**

### **7.1. Внесение образцов**

Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 20 мкл калибровочных образцов 0, 1, 3, 10, 30 и 60 нмоль/л. В следующую пару лунок внести по 20 мкл контрольного образца.

В остальные лунки всех используемых стрипов внести по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Для повышения достоверности результатов исследуемые образцы рекомендуется анализировать в дублях, используя для каждого образца по две лунки.

*Время внесения образцов не должно превышать 15 мин при использовании всех лунок планшета.*

### **7.2. Внесение конъюгата**

В лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата (п. 6.3.).

*Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

### **7.3. Инкубация**

Планшет заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37°C в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.

### **7.4. Промывка**

По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 6.2.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

### **7.5. Внесение ТМБ**

Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (п. 6.4.).

*Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

### **7.6. Инкубация**

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37°C в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.

### **7.7. Внесение стоп-реагента**

Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина.

Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

Краткая схема проведения ИФА приведена в приложении 1 в конце настоящей инструкции.

### **7.8. Проведение измерения**

Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции или после встряхивания планшета не менее 5 секунд. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

## **8. 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 контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

ОП<sub>0</sub>, ОП<sub>1</sub>, ОП<sub>3</sub>, ОП<sub>10</sub>, ОП<sub>30</sub> и ОП<sub>60</sub> – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 1, 3, 10, 30 и 60 нмоль/л соответственно.

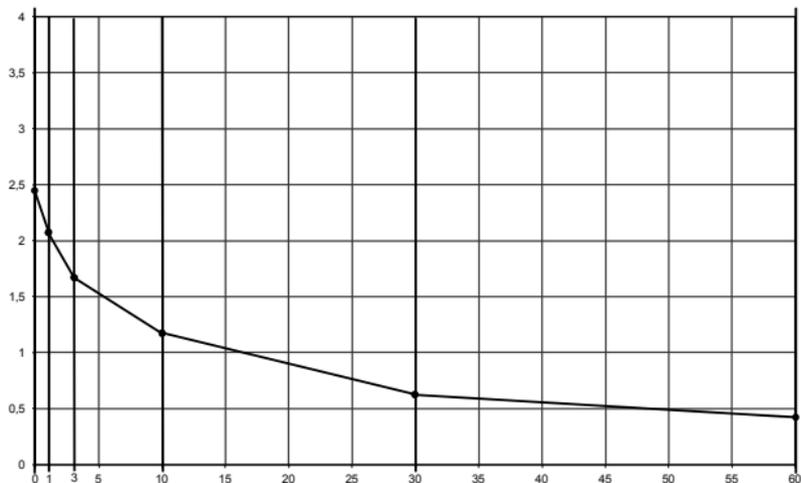
## 9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации тестостерона (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

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 ли-



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

### Пример 1

| Калибровочный образец, содержащий тестостерон | Значение ОП о.е. | Конц-ция тестостерона (определенная по графику) |
|---|------------------|---|
| 60 нмоль/л                                    | 0,418            | –   |
| 30 нмоль/л                                    | 0,632            | –   |
| 10 нмоль/л                                    | 1,157            | –   |
| 3 нмоль/л                                     | 1,681            | –   |
| 1 нмоль/л                                     | 2,070            | –   |
| 0 нмоль/л                                     | 2,451            | –   |
| Контрольный образец                           | 0,866            | 19,5  |
| Анализируемый образец                         | 1,260            | 7,75  |

нию, 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 (см. пример 1).

### 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.

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

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор реагентов следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

По окончании срока годности набор не использовать.

Замораживание набора не допускается.

**Дробное использование** набора может быть реализовано в пределах срока годности. **В случае дробного использования** набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации тестостерона в контрольном образце.

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

*Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.*

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

## **12. КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

**По вопросам, касающимся качества набора,**  
обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:  
630559, Новосибирская обл.,  
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,  
тел. /факс (383) 363-13-46  
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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

**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°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин,  
в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

10.04.14.



ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международные сертификаты  
ISO 9001 и ISO 13485

**НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА**

Вирусные гепатиты А, В, С, D, Е, G, ТТ;  
ВИЧ-инфекция; ИППП; ТОРСН-инфекции;  
герпесвирусные инфекции; беременность;  
аутоиммунные, системные, паразитарные,  
желудочно-кишечные заболевания;  
гормоны; опухолевые и кардиомаркеры;  
цитокины, аллергены и др.

***Точная диагностика –  
эффективное лечение!***

**Наш адрес:** 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,  
332-67-49, 332-67-52

*E-mail:* [vbmarket@vector-best.ru](mailto:vbmarket@vector-best.ru)

Internet: [www.vector-best.ru](http://www.vector-best.ru)