

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

2095-18, Testosterone ELISA

Каталог. № : 2095-18

Методика от 03-26-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения тестостерона в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Тестостерон ИФА основывается на принципе конкурентоспособного связывания между тестостероном в анализируемом образце и тестостерон-HRP конъюгатом, в стабильном количестве анти-тестостерона кролика. В процессе инкубации лунки, покрытые козлиным анти-кроличьим IgG инкубируются при 37°C) в течении 90 минут с 10 мкл стандартов тестостерона, контролями, образцами пациентов, 100 мкл реагента тестостерон-HRP конъюгата 50 мкл реагента анти-тестостерона кролика. В течение инкубации, закрепленное количество HRP-меченого тестостерона конкурирует с эндогенным тестостероном в стандарте, образце, или сыворотке контроля качества на определенных местах связывания специфического антитела тестостерона. Таким образом, количество конъюгата пероксидазы тестостерона, иммунологически связанного с лункой, интенсивно уменьшается, так как концентрация тестостерона в образце увеличивается.

Затем несвязанный конъюгат пероксидазы тестостерона удаляется и лунки промываются. Затем, добавляется раствор ТМВ реагента и инкубируется при комнатной температуре в течении 20 минут, приводя к образованию синего цвета. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, и абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна количеству присутствующего фермента и противоположна количеству непомяченного тестостерона в образце. Калибровочная кривая получается путем составления графика концентрации стандарта против меры поглощения света. Концентрация тестостерона в образцах и контролях, анализируемая одновременно со стандартами может быть рассчитана от калибровочной кривой.

ЗАБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Для анализа должна использоваться только сыворотка человека.
- Образцы не нуждаются в специальной предварительной обработке.
- Образцы сыворотки могут храниться до 24 часов при 2-8°C и должны замораживаться при -10°C или ниже при более длительном хранении. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.
- Примечание:** не должны использоваться образцы, содержащие азид натрия.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые в наборе материалы:

- Козлиные анти-кроличьи IgG-покрытые микротитровальные лунки, 96 лунок.
- Референтные стандарты тестостерона: 0, 0,1, 0,5, 2,0, 6,0 и 18 нг/мл. Жидкие, по 0,5 мл каждый, готовые к использованию.
- Реагент кроличьего анти-тестостерона (розового цвета), 7 мл.
- Реагент тестостерон-HRP конъюгата (синего цвета), 12 мл.
- Тестостерон контроль 1 и 2, жидкий, 0,5 мл, готовый к использованию.
- ТМВ реагент (одноэтапный), 11 мл.
- Стоп раствор (1 N HCl), 11 мл.

Требуемые, но не поставляемые материалы:

- Точные пипетки: 10, 50, 100 мкл и 1,0 мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток.

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Вихревой смеситель или его аналог.
- Абсорбирующая бумага или бумажное полотенце.
- Миллиметровая бумага.
- Микротитровальный планшетный считыватель.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАГЕНТОВ

- Приведите все реагенты, что будут использоваться к комнатной температуре (18-25 °C).
- Образцы с ожидаемыми концентрациями тестостерона более чем 18 нг/мл могут быть проанализированы количественно путем разбавления разбавителем, располагаемым продавцом.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Поместите в держателе желаемое количество покрытых лунок, которые будут использоваться.
- Пипеткой внесите 10 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки.
- Внесите 100 мкл реагента тестостерон-HRP конъюгата в каждую лунку.
- Распределите 50 мкл реагента кроличьего анти-тестостерона в каждую лунку.
- Тщательно перемешайте в течение 30 сек. Очень важно полностью перемешать.**
- Инкубируйте 90 минут при 37°C.
- Промойте лунки дистиллированной или деионизированной водой 5 раз и встряхните их содержимое. (Не использовать проточную воду).
- Внесите 100 мкл ТМВ реагента в каждую лунку. Осторожно перемешайте в течении 10 сек.
- Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре (18-25°C).
- Остановите реакцию путем добавления 100 мкл стоп раствора в каждую лунку.
- Осторожно перемешайте в течении 30 сек. **Очень важно убедиться в том, что весь синий цвет стал полностью желтым.**
- Измерьте абсорбцию при 450 нм с помощью микротитровального планшетного считывателя **в течении 15 минут.**

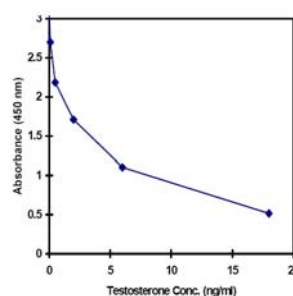
ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Вычислите значение средней абсорбции (A_{450}) для каждого набора референтных стандартов, контролей и образцов.
- Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации в нг/мл на **миллиметровой бумаге** при значениях абсорбции на оси Y и концентрациях на оси X.
- Используя значения средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию тестостерона в нг/мл на калибровочной кривой.
- Любые значения полученные для разбавленных образцов должны быть конвертированы, используя при вычислении соответствующий фактора разбавления.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной процедуры анализа стандарта, выполненного с чтениями оптической плотности при 450 нм показанный на Y оси против концентраций тестостерона, показанных в оси X. **Примечание:** Эта калибровочная кривая предназначена только для иллюстрации, и не должна использоваться для вычисления неизвестных величин. Каждая лаборатория в каждом эксперименте должна разработать свои собственные данные и калибровочную кривую.

Тестостерон (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	2.432
0.1	1.750
0,5	1.161
2,0	0.832
6,0	0.537
18,0	0.208



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация тестостерона ИФА при измеренных 2 CO из среднего значения нулевого стандарта составила 0,05 нг/мл.

2. Точность

а. Точность в анализе

Точность в анализе была определена путем анализа репликатов 4 разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариативность в анализе указана ниже:

Образцы	1	2	3	4
К-во репликатов	24	24	24	24
Средн. Тестостерона (нг/мл)	0,44	3,7	5,1	12,7
CO	0,03	0,4	0,4	0,6
КВ (%)	6,4	10,0	8,3	5,0

б. Точность между анализами

Точность между анализами была определена путем анализа репликатов 6 разных образцов сыворотки в ряде отдельно откалиброванных анализов. Вариативность между анализами указана ниже:

Образцы	1	2	3	4
К-во репликатов	20	20	20	20
Средн. тестостерона (нг/мл)	0,45	3,4	5,0	13,3
CO	0,02	0,3	0,2	0,5
КВ (%)	4,4	8,4	4,4	3,7

3. Исследование восстановления

Различные образцы сыворотки пациентов известных уровней тестостерона были объединены или проанализированы в дубликаты. Среднее восстановление составило 95,3%.

№ пары	Ожидаемое (нг/мл)	Полученное (нг/мл)	% восстановления
1	8,7	9,2	105,9
2	9,3	9,6	103,6
3	6,3	5,2	83,2
4	5,0	5,0	99,9
5	2,6	3,3	127,5
6	2,4	2,3	97,5
7	0,66	0,46	70,4
8	0,61	0,46	74,6

4. Специфичность

Следующие вещества были проверены на перекрестную реактивность. Процент указывает на перекрестную реактивность при смещении 50 % по сравнению с тестостероном.

Данные относительно перекрестной реактивности для нескольких эндогенных и фармацевтических стероидов обобщены в следующей таблице:

Перекрестная реактивность (%) = $\frac{\text{Полученная концентрация тестостерона}}{\text{Концентрация стероида}} \times 100$

Стероид	Перекрестная реактивность
Тестостерон	100%
Дигидротестостерон	0.086%
Андростенедион	0.89%
Андростерон	1.0%
17β эстрадиол	0.05%
Прогестерон	<0.05%
Эпитестостерон	<0.05%
17-ОН-Прогестерон	<0.05%
Эстриол	<0.05%
Кортизол	<0.05%
DHEA-Сульфат	<0.05%

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Квалифицированная лабораторная практика требует, чтобы контроли использовались в каждой калибровочной кривой. Статистически важное количество контролей должно анализироваться, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, чтобы обеспечить соответствующую эффективность набора.

В качестве контроля рекомендуется использовать **BIO-RAD LYRNOSNEK IMMUNOASSAY CONTROL SERA**. Данный набор также поставляется с внутренними контролями, Уровень 1 и 2.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Не существует методик, дающих полную гарантию отсутствия вируса гепатита В, ВИЧ/ЛАВ, или других инфекционных агентов в реакентах набора. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы пациентов, должны рассматриваться как потенциально инфекционными.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, что каждая лаборатория установила собственные значения нормы. Тестостерон ИФА исследовался на клинических лабораторных образцах выборочных пациентов.

Мужчины: дети (подростки)	0.1 – 0.2 нг/мл
Взрослые	3,0 – 10.0 нг/мл
Женщины: дети (подростки)	0.1 – 0.2 нг/мл
фолликулярная фаза	0.2 – 0.8 нг/мл
Лютеальная фаза	0.0 – 0.8 нг/мл
Пост-менопауза	0.08 – 0.035 нг/мл

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Достоверные и воспроизводимые результаты будут получены, когда процедура анализа выполнена с полным пониманием указаний вкладыша набора и при соблюдении квалифицированной лабораторной практики.
2. Процедура промывки крайне важна. Недостаточная промывка приведет к неполной точности и ошибочно повышенным считываниям абсорбции.
3. Не используйте в анализе сильно гемолизированные, липемические или мутные образцы.
4. Результаты, полученные от использования этого набора должны использоваться только как дополнение к другим диагностическим процедурам и информации, располагаемой врачом.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Невыскранные наборы должны храниться после из получения при 2-8°C и микротитровальный планшет должны содержаться в герметичном пакете с осушителями, чтобы минимизировать влияние влажного воздуха. Открытые наборы будут сохранять свою активность до окончания срока годности при соблюдении вышеуказанных условий хранения. Микротитровальный планшетный считыватель с шириной световой дорожки 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-3 ОП при длине волны 450 нм подходит для использования измерения абсорбции.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com