

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

## 2095Z, Testosterone ELISA

Каталог. № : 2095Z  
Производитель: DAI (США)

Методика от 03-26-2013



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

1. Для анализа должна использоваться только сыворотка человека.
2. Образцы не нуждаются в специальной предварительной обработке.
3. 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.
4. **Примечание:** не должны использоваться образцы, содержащие азид натрия.

### РЕАГЕНТЫ

Поставляемые в наборе материалы:

1. Козлиные анти-кроличьи IgG-покрытые микротитровальные лунки, 96 лунок.
2. 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.
3. Реагент кроличьего анти-тестостерона (розового цвета), 7 мл.
4. Реагент тестостерон-HRP конъюгата (синего цвета), 12 мл.
5. Тестостерон контроль 1 и 2, жидкий, 0,5 мл, готовый к использованию.
6. ТМВ реагент (одноэтапный), 11 мл.
7. 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 РЕАГЕНТОВ

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

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

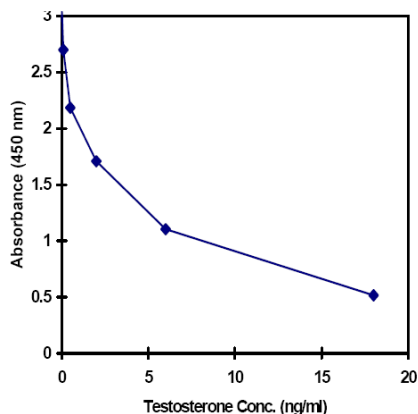
### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите значение средней абсорбции ( $A_{450}$ ) для каждого набора референтных стандартов, контролей и образцов.
2. 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.
3. Используя значения средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию тестостерона в нг/мл на калибровочной кривой.
4. 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 на 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	8.32
6,0	0.537
18,0	0.208



## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 1. Чувствительность

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

### 2. Точность

#### a. 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
СО	0,03	0,4	0,4	0,6
КВ (%)	6,4	10,0	8,3	5,0

#### b. 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
СО	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 LYRНОСНЕК 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 реагентах 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

Не вскрытые 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.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)