

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

## 2924-17, Free Testosterone

Каталог. № : 2924-17  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 09-09-2010



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

Анализ	Free Testosterone ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурирующий конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-100 пг/мл
Образец	20 мкл сыворотки
Специфичность	100%
Чувствительность	0,6 пг/мл
Общее время	~ 110 мин.
Срок годности	12-14 мес.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор является конкурентоспособным колориметрическим методом для количественного определения концентрации свободного тестостерона в сыворотке и плазме.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

### ПРИНЦИП

Свободный тестостерон (антиген) в образце конкурирует с пероксидазой хрена тестостероном (фермент-меченный антиген) за связывание к ограниченному числу анти-тестостерон (антитело) сторон на микропланшете (твердая фаза).

После инкубации связывание/свободное разделение проводится простой твердофазовой промывкой.

Ферментный субстрат (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и ТМВ субстрат (ТМВ) добавляется. После истечения времени, достаточного для развития окраса, ферментная реакция останавливается и определяется абсорбция. Концентрация свободного тестостерона в образце вычисляется на базе серии стандартов.

Интенсивность окраса обратно пропорциональна концентрации свободного тестостерона в образце. Тестостерон в крови связан с SHBG (60%) и в низком количестве с альбумином 1-2%, только определение свободного тестостерона дает возможность оценить биологическую активность гормона.

### РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

1. Поставляемые в наборе реагенты и материалы
2. Стандарты свободного тестостерона (6х)(1 фл. = 1 мл).
3. Конъюгат, 1 бутылка, 15 мл, Тестостерон, конъюгированный с пероксидазой.
4. Покрытый микропланшет (1 делимый микропланшет). Лунки покрытые антителами класса IgG к тестостерону.
5. ТМВ-субстрат (1 бутылка), 15 мл.
6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ТМВ 0,26 г/л (избегайте контакта с кожей).
7. Стоп-раствор (1 бутылка), 15 мл.
8. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,15 моль/л (избегайте контакта с кожей).
9. Конц. промывочный раствор 10х (1 бутылка = 50 мл)
10. NaCl 160 г/л; твин-20 10 г/л
11. 20 мМ фосфатный буфер, pH 7,4.

2. Необходимые материалы, но не поставляемые  
Дистиллированная вода.

3. Дополнительные материалы и инструментарий  
Автоматический дозатор.  
Планшет-ридер.

### Примечание:

Храните все реагенты при 2-8°C в темноте. Вскрываете пакет с микропланшетом, только когда достигнута комнатная температура и немедленно закрываете после использования.

После вскрытия микроплшета он остается стабильным до окончания срока годности набора. Не удаляйте адгезивные покрытия на не утилизированных полосках.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Реагенты содержат Rroclin 300<sup>R</sup> в качестве консерванта.
- Избегайте попадания прямого солнечного света, металлов или оксидантов на реагент ТМВ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Необходимая максимальная точность при растворении и внесении реагентов.
- Не используйте реагенты с разными сериями.
- Не используйте высоко гемолизированные образцы.
- Этот метод дает возможность определения свободного тестостерона в диапазоне 0,06 пг/мл – 100,0 пг/мл.
- Клиническое значение определения свободного тестостерона может быть неверным, если пациент поддавался терапии кортизоном, натуральными или синтетическими стероидами.
- При использовании автоматического аппарата пользователь несет ответственность за правильность проведения исследования.

### ПРОЦЕДУРА

#### 1. Подготовка стандарта (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>)

Перед использованием, смешайте 5 минут вращающим миксером. Стандарты имеют следующую концентрацию свободного тестостерона: 0, 0,2, 1,0, 4,0, 20,0 и 100,0 пг/мл. После вскрытия стабилен шесть месяцев при +4°C.

#### 2. Подготовка образца

Определение свободного тестостерона может проводится на плазме и сыворотке, полученных от пациентов натошак. Храните образец при -20°C, если определение не проводится в день сбора образцов.

#### 3. Подготовка промывочного раствора

Перед использованием разбавьте содержимое флакона "Конц. промывочного раствора 10X" дистиллированной водой до конечного объема 500 мл. Для меньших объемов соблюдайте пропорцию разбавления 1:10. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при 2-8°C. В концентрированном промывочном растворе возможно наблюдать присутствие кристаллов. В этом случае перемешивайте при комнатной температуре до полного растворения кристаллов. Для большей тщательности разбавьте целую бутылку концентрированного промывочного раствора до 500 мл. Также осторожно переместите во время промывки бутылки, затем перемешайте до полного растворения кристаллов.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Поскольку необходимо проводить определение в дубле, приготовьте две лунки для каждой из пяти точек калибровочной кривой (0-5), две для каждого образца и одну для бланка. Внесите:

	Стандарт	Образец	Бланк
Стандарт (0-5)	20 мкл	-	-
Образец	-	20 мкл	-
Конъюгат	100 мкл	100 мкл	-

Инкубируйте при 37°C 1 час.

Удалите содержимое каждой лунки, промойте лунки 3 раза 300 мкл разбавленного промывочного раствора. Полностью удалите промывочный раствор.

ТМВ субстрат	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------	---------

Инкубируйте при комнатной температуре (22-28°C) 15 минут в темноте.

Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------	---------

Считайте абсорбцию (E) при 450 нм против бланка.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальным, низким и высоким уровнем свободного тестостерона для мониторинга проведения анализа. Таблицы контроля качества должны заполняться для контроля качества поставляемых реагентов. Каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны измерения.

## ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Микробиологически загрязненные образцы не должны использоваться в анализе. Высоко липемические или гемолизированные образцы также не должны использоваться. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут. При использовании более чем одного планшета рекомендуется повторить кривую ответной дозы. Добавление субстратного и раствора должно проводиться в одинаковой последовательности во избежание любого отклонения во времени реакции. При использовании компьютерной обработки данных для подсчета результатов анализа, ожидаемые значения калибраторов обязательно будут ниже на 10% от установленных концентраций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Средняя абсорбция

Вычислите среднюю абсорбцию ( $E_m$ ) соответственно точкам стандартной кривой и каждого образца.

### 2. Калибровочная кривая

Выведите значения стандартов ( $E_m$ ) против концентрации. Экстраполируйте линию, которая проходит через точки.

### 3. Вычисление результатов

Интерполируйте значения образцов на стандартной кривой для получения соответствующих значений концентрации, выраженных в пг/мл.

## РЕФЕРЕНТНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

	Медиана	Среднее $\pm 1\text{СО}$ пг/мл	Диапазон пг/мл
Здоровые мужчины	14	13 $\pm$ 7	4,5-42
Женщины: овуляция	1,3	1,4 $\pm$ 0,9	НО-4,1
Оральные контрацептивы	0,9	1,1 $\pm$ 0,6	0,3-2,0
Постменопауза	0,8	0,9 $\pm$ 0,5	0,1-1,7

## ПРОДУКТИВНОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Точность

#### 1. Вариация в анализе

Вариация в анализе была определена измерением репликата (15x) трех разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариабельность в анализе составляет < 10%.

#### 2. Вариация между анализами

Вариация между анализами была определена измерениями репликатов трех разных контрольных сывороток и двух образцов сыворотки 10 различных партий. Вариабельность между анализами составила < 10%.

### Чувствительность

Предел чувствительности рассчитывался линейной регрессией от средней абс. Нулевого стандарта и стандарта 1, затем добавлялось 2-е СО абс. Нулевого стандарта. Самая низкая определяемая концентрация свободного тестостерона составляет 0,06 пг/мл.

### Специфичность

Специфичность была оценена путем измерения явной реакции анализа на следующие потенциально перекрестно-реагирующие аналиты и влияющие вещества (антикоагулянты). Перекрестная реакция на уровне 50% за методом Абрахама указана в таблице:

Аналит	Перекрестная реактивность %
Тестостерон	100
Дегидротестостерон	0,00008
Андростендион	0,0043
Андростерон	0,00029
ДГЕА-С	0,00007
Кортизол	< 0,00001
Кортизон	< 0,00001
17- $\beta$ -эстрадиол	0,00005
Эстрон	< 0,00001
Преднизон	< 0,00001
17- $\alpha$ -этинилэстрадиол	< 0,00001
Норгестрел	0,00001
Даназол	< 0,00001
Альдостерон	< 0,00001
Цитрат натрия	< 0,00001
ЭДТА	< 0,00001
Гепарин	< 0,00001

## Корреляция

Набор свободного тестостерона компании ДАИ был сравнен с настоящим набором. Образцы сыворотки 24 женщин и 17 мужчин исследовались обеими системами анализа.

Линейная регрессия была определена следующим образом:

$$\text{ДАИ} = 0,957 * (\text{РИА}) + 0,953$$

$$R^2 = 0,937$$

## УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться с соблюдением местных требований.



## 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)