



Набор ИФА для определения СВОБОДНОГО ТЕСТОСТЕРОНА

Кат. № : EIA-2924
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 10-2012
Версия 18.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения концентрации свободного тестостерона в сыворотке или плазме.

Набор предназначен только для лабораторного применения.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Свободный тестостерон (антиген) в образце конкурирует с пероксидазой хрена тестостероном. (ферментомеченным антигеном) за ограниченного количества зон анти-тестостерона (антител) на микропланшетах (твердая фаза).

После инкубации связанное/свободное отделение проводится простой твердофазовой промывкой.

Фермент в связанной фракции взаимодействует со субстратом (H₂O₂) и субстратом ТМБ и развивает синий цвет, который после добавления стоп-раствора становится желтым.

Интенсивность цвета обратно пропорциональна концентрации свободного тестостерона в образце.

Концентрация свободного тестостерона в образце рассчитывается на основании калибровочной кривой.

Тестостерон в крови связан с ПГСГ (60%) и в меньшем количестве с другим протеином. Только измерение свободного тестостерона (<1% общего тестостерона) позволяет определить биологически активный гормон.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Поставляемые в наборе реагенты и материалы

1. **Стандарт свободного тестостерона (стандарт 0-5)**, 6 флаконов по 1 мл каждый.
2. **Контроль свободного тестостерона**, 1 флакон по 1 мл.
Концентрация контроля зависит от серии и указана в листе контроля качества.
3. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 15 мл, конъюгированный с пероксидазой хрена.
4. **Микротитровальные лунки** (1 делимый микропланшет). Лунки покрыты анти-тестостерон антителом IgG.
5. **Раствор субстрата ТМБ**, 1 флакон, 15 мл. H₂O₂ / ТМБ 0.26 г/л.
Избегать любого контакта с кожей.
6. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 15 мл. Серная кислота, 0,15 моль.
Избегать любого контакта с кожей.
7. **Промывочный раствор**, 10х концентрат, 1 флакон 50 мл.

3.1 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор:

- Дистиллированная вода.

3.2 Дополнительные материалы и инструментарий

- Автоматический дозатор.
- Микроплашетный ридер (450 нм).

Примечание

Хранить все реагенты при 2-8°C в темном месте.

Вскрывать упаковку реагента 4 (покрытый микропланшет) только при достижении комнатной температуры и закрывать его сразу после использования.

После вскрытия микропланшет стабильный до истечения срока годности набора.

3. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Реагенты содержат проклин 300 в качестве консерванта.
- Избегайте воздействия прямого солнечного света, металлов и окислителей на реагенты ТМБ/H₂O₂.
- Максимальная точность требуется для растворения и распределения реагентов.
- Не используйте реагенты разных серий.
- Не используйте сильно гемолизованные образцы.
- Этот метод позволяет определить уровень свободного тестостерона от 0,06 пг/мл до 100,0 пг/мл.
- Клиническое значение определения свободного тестостерона может быть опровергнуто если пациент прошел терапию кортизоном, природными или синтетическими стероидами.
- При использовании автоматического аппарата, пользователь несет ответственность, чтобы убедиться в надежности набора.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1 Подготовка стандартов (S0-S5)

Перемешивать перед использованием 5 минут с помощью вращающегося миксера.

Стандарты имеют следующие концентрации свободного тестостерона:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
пг/мл	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

После вскрытия стандарты стабильны 6 месяцев при 2-8°C.

5.2 Подготовка образца

Определение свободного тестостерона может быть выполнено на человеческой сыворотке или плазме.

Хранить образец при температуре -20°C, если определение не производится в день забора.

5.3 Подготовка промывочного раствора

Перед использованием разбавить содержимое флакона промывочного раствора дистиллированной водой до конечного объема 500 мл.

При меньших объемах соблюдать пропорцию разбавления 1:10.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.

В концентрированном промывочном растворе возможно наблюдать наличие кристаллов. В этом случае перемешивайте его при комнатной температуре до полного растворения кристаллов. Для большей тщательности разведите целую бутылку концентрированного промывочного раствора до 500 мл, соблюдая перенесение всех кристаллов, затем перемешайте до полного растворения кристаллов.

5.4 Процедура

Так как необходимо выполнить определение в двух экземплярах, подготовить две лунки для каждой из пяти лунок калибровочной кривой (S0-S5), по две для каждого образца, две для контроля и одну для бланка.

Реагент	Стандарт	Образец/ контроль	Бланк
Стандарт S0-S5	20 мкл		
Образец / контроль		20 мкл	
Ферментный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубировать при 37 ° C в течение 1 часа. Удалить содержимое из каждой лунки; промыть лунки три раза 300 мкл разбавленного промывочного раствора.			
Раствор субстрата ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать при температуре 22-28 ° C 15 мин. в темном месте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Осторожно встряхнуть микропланшет. Считать абсорбцию (E) при 450 нм относительно бланка.			

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли при нормальном, высоком и низком уровнях диапазона свободного тестостерона для мониторинга процедуры анализа. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные, а значения определяются в каждой проведенной процедуре исследования. Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений.

7. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Микробиологически загрязненные образцы не должны использоваться в анализе.

Высоколипемические или гемолизированные образцы также не должны использоваться.

Важно, чтобы время реакции в каждой лунке было стабильным для получения воспроизводимых результатов.

Пипетирование образцов не должно занимать более десяти минут, чтобы избежать смещения результатов анализа. Если он длится более десяти минут, следуйте тому же порядку внесения.

Если используется более одного планшета, рекомендуется повторить кривую реактивности дозы.

Добавление раствора субстрата ТМБ инициирует кинетическую реакцию, которая заканчивается добавлением стоп-раствора. Таким образом, ТМБ субстрат и стоп-раствор должны быть добавлены в той же последовательности, чтобы устранить любые отклонения во времени в ходе реакции.

Планшет-ридеры измеряют вертикально. Не прикасайтесь к нижней части лунки.

Недостаточное удаление соответствующей жидкости в промывочных этапах аспирации или декантации может привести к недостаточной репликации и сомнительным результатам.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1 Средняя абсорбция

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

8.2 Калибровочная кривая

Выведите значения стандартов (E_m) против концентрации. Экстраполируйте линию, которая проходит через точки. (напр., 4-параметрическая логистическая).

8.3 Вычисление результатов

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

9. РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрации свободного тестостерона в сыворотке в пределах следующих диапазонов:

	Медиана	Среднее $\pm 1\text{СО}$ пг/мл	Диапазон пг/мл
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

10. ПРОДУКТИВНОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

Вариация в анализе

Вариация в анализе была определена измерением репликата (15х) трех разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариабельность в анализе составляет $\leq 10\%$.

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 $< 10\%$.

10.2 Чувствительность

Чувствительность была оценена путем использования точек более 20 репликатов нулевого стандарта и минимум 2 репликата первой калибровочной точки.

Самая низкая определяемая концентрация свободного тестостерона от нулевого стандарта составляет 0,06 пг/мл.

10.3 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- β -эстрадиол	0,00005
Эстрон	$< 0,00001$
Преднизон	$< 0,00001$
17- α -этинилэстрадиол	$< 0,00001$
Норгестрел	0,00001
Даназол	$< 0,00001$
Альдостерон	$< 0,00001$
Цитрат натрия	$< 0,00001$
ЭДТА	$< 0,00001$
Гепарин	$< 0,00001$

10.4 Корреляция РИА

Набор свободного тестостерона был сравнен с имеющимся на рынке набором свободного тестостерона РИА. Образцы сыворотки 24 женщин и 17 мужчин исследовались обеими системами анализа. Линейная регрессия была определена следующим образом:

$$EIA-2924 = 0,957 * (РИА) + 0,953$$

$$r^2 = 0,937$$

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться с соблюдением местных требований.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua