

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

EIA-1559, Testosterone ELISA

Каталог. № : EIA-1559
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 06-2009
Версия 8.0



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

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

Настоящий набор является иммуноферментным анализом для количественного определения *in vitro* тестостерона в сыворотке и плазме крови.

1.2 Краткое описание и объяснение

Тестостерон (17 бета-гидрокси-4-андростерон-3-один) стероид C19 с насыщенным связью между C-4 и C-5, кетонной группой в C-3 и гидроксильной группой в бета позиции в C-17. Он имеет молекулярный вес 288,47.

Тестостерон наиболее важный андроген, секретируемый в кровь. У мужчин тестостерон первично секретируется клетками Лейдига, у женщин около 50% циркулирующего гормона образуется от периферической конверсии андростендиона, а 25% - с яичников, и 25% - адrenaльных желез.

Тестостерон отвечает за развитие вторичных половых признаков у мужчин и его измерение может быть полезным при оценке гипогонадных состояний.

У женщин высокие уровни тестостерона в основном бывают при гирсутизме и вирилизации, поликистозе яичников, опухолей яичников и адrenaльной гиперплазии.

У мужчин высокие уровни тестостерона ассоциируются с гипоталамическим питуитаризмом, опухолями яичков, врожденной адrenaльной гиперплазией и раком простаты.

Низкие уровни могут быть при гипопитуитаризме, синдроме Кляйнфельтера, тестикулярной феминизации, крипторхизме и удалении яичек, ферментных дефектах и некоторых иммунных заболеваниях.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Тестостерон ELISA, твердофазный ферментно связанный иммуносорбентный тест базируется на принципе конкурентного связывания.

Лунки микропланшета покрыты антителом, направленным против уникальной антигенной стороны молекулы тестостерона.

Эндогенный тестостерон образцов пациентов конкурирует с тестостероном, конъюгированным с пероксидазой конкурируют за связывание с антителом, которым покрыто дно лунок. После инкубации планшет промывается.

Количество связанного конъюгата пероксидазы обратно пропорционально концентрации тестостерона в образце. После добавления раствора субстрата интенсивность развития окраса обратно пропорционально концентрации тестостерона в образце.

3. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Для диагностики *in vitro*.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами

и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.

- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток и микропланшетных считывателей.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Лист данных безопасности доступен по требованию.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микрострипы**, 12x8 стрипов, 96 лунок
Лунки покрытые мышинным моноклональным анти- тестостерон антителом
2. **Стандарт (стандарт 0-6)**, 7 фл., 1 мл, готовый к использованию
Концентрации: 0-0,2-0,5-1-2-6-16 нг/мл
Конверсия: 1 нг/мл=3,467 нмоль/л
вмещает 0,03% Проклина 300 + 0,005% гентамицина как консервант.
3. **Ферментный конъюгат**, 1 фл., 25 мл, готовый к использованию
Тестостерон, конъюгированный с пероксидазой хрена вмещает 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,10% MIT как консерванта.
4. **Раствор субстрата** 1 фл., 25 мл, готовый к использованию.
ТМВ
5. **Стоп раствор**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию
Содержит H₂SO₄ 0,5M

Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать раздражения и ожоги.

6. **Раствор для промывания** (40x), 1 фл., 30 мл
См. «Приготовление реагентов»

Примечание: *Дополнительный 0 стандарт для разбавления образца доступен по запросу.*

4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный откалиброванный считыватель, способный проводить измерения при 450 нм ±10 нм (напр. микропланшетный считыватель фирмы DRG).
- Калиброванные точные пипетки.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

4.3 Условия хранения

При хранении при 2-8°C неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитрационные лунки необходимо хранить при 2-8°C. Как только фольговая упаковка была открыта, нужно следить за тем, чтобы она была тщательно закрыта после использования.

4.4 Подготовка реагентов

Приведите все реагенты и стрипы, что будут использоваться к комнатной температуре.

Промывочный раствор

Добавьте 1170 мл деионизированной воды к промывочному буферу (30 мл), чтобы достичь окончательный объем 1200 мл. *Разбавленный промывочный буфер стабилен 2 недели при комнатной температуре.*

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно национальным требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности (см. раздел 13).

4.6 Повреждение набора

При повреждении набора или компонентов, необходимо письменно уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться сыворотка или плазма (EDTA, гепарин или цитратная плазма).

Не используйте для анализа гемолизированные, иктерические и липемические пробы.

Внимание: не должны использоваться образцы, которые содержат азид натрия.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Пациентам, которые проходят антикоагулянтную терапию, необходимо увеличить продолжительность процесса свертывания крови.

Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и ее нужно центрифугировать сразу же после забора.

(Например, для EDTA плазмы - Sarstedt Monovette – красная крышка - # 02.166.001; для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette – оранжевая крышка - # 02.165.001; для цитратной плазмы - Sarstedt Monovette – зеленая крышка - # 02.167.001)

5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 5 дней при 2-8°C. Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить 0 стандартом и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

Например:

а) Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);

б) Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Рекомендуется, чтоб перед началом анализа все необходимые реагенты были приготовлены, крышечки сняты, все нужные лунки установлены в держателе и т.д. Это обеспечит равное время для каждого шага пипетирования без прерывания.
- В основном энзимная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Каждый анализ должен включать стандартную кривую.

1. Поместите стрипы, которые будут использованы в анализе в специальный держатель стрипов.
2. Пипеткой внесите **25 мкл** каждого стандарта, контроля и образца, используя новые наконечники, в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **200 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку планшета. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **60 минут** при комнатной температуре (не накрывая планшет).
5. Резко встряхните содержимое лунок.

Промойте разведенным промывочным раствором три раза (**400 мкл** на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

Важное замечание:

Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!

6. Добавьте **200 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **100 мкл** стоп реагента в каждую лунку.

9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси У и концентрации на оси Х.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты. Другие функции обработки данных могут дать немного другой результат.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Пример типичной стандартной кривой

Последующие данные используются только в демонстрационных целях и **не должны** использоваться вместо обработки данных во время анализа.

Стандарт	нг/мл	Опт. единицы (450 нм)
Стандарт 0	0	2,1
Стандарт 1	0,2	1,71
Стандарт 2	0,5	1,44
Стандарт 3	1	1,18
Стандарт 4	2	0,89
Стандарт 5	6	0,46
Стандарт 6	16	0,24

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ - НОРМА

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

При изучении очевидно здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие данные:

Популяция	Процентиль 5%	Процентиль 95%
Мужчины	2,0 нг/мл	6,9 нг/мл
Женщины	0,26 нг/мл	1,22 нг/мл

Отдельно взятые результаты не должны быть единственным основанием для любых терапевтических заключений. Эти результаты должны быть сопоставлены с другими клиническими наблюдениями и диагностическими исследованиями.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0-16 нг/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность.

Соединение	Перекрестная реактивность
Тестостерон	100
5α-Дегидротестостерон	0,8
Андростендион	0,9
11β-Гидроксиэстостерон	3,3

17α-Метилтестостерон	0,1
19-нортестостерон	3,3
Эпитестостерон	<0,1
Оэстрадиол	<0,1
Прогестерон	<0,1
Кортизол	<0,1
Оэстрон	<0,1
Даназол	<0,1

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена для среднего минус два стандартных отклонений 20 репликантов анализа 0 стандарта и равно 0,083 нг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4 Вариация

В анализе				Между анализами			
Обра-зец	К-во	Среднее нг/мл	КВ %	Обра-зец	К-во	Среднее нг/мл	КВ %
1	20	0,73	4,16	1	20	0,82	9,94
2	20	4,88	3,28	2	20	5,20	6,71
3	20	11,26	3,34	3	20	11,38	4,73

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением тестостерона раствора при известной концентрации 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены добавлением половины значения, определенных для неразбавленных образцов и половины значений для известных растворов. % восстановления был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Добавл. конц. 1:1 (о/о) (нг/мл)	Полученная конц., нг/мл	Ожидаемая конц., нг/мл	Восста-новление
1	0,0	1,10		
	16,0	9,31	8,55	109,0
	6,0	3,93	3,55	110,7
	2,0	1,67	1,55	107,9
	1,0	0,91	1,05	86,9
2	0,0	6,07		
	16,0	11,81	11,03	107,1
	6,0	6,65	6,03	110,1
	2,0	3,73	4,03	92,5
	1,0	3,26	3,53	92,2
3	0,0	11,62		
	16,0	14,76	13,63	108,3
	6,0	9,33	8,63	108,1
	2,0	7,29	6,63	110,0
	1,0	6,75	6,13	110,1

9.6 Линейность

Образец	Разбавление	Полученная конц., нг/мл	Ожидаемая конц., нг/мл	Восста-новление
1	Нет	1.10	1.10	
	1:2	0.51	0.55	93.8
	1:4	0.24	0.27	86.1
	1:8	0.15	0.14	106.6
	Нет	6.07	6.07	
2	1:2	3.36	3.03	110.6
	1:4	1.66	1.52	109.2
	1:8	0.68	0.76	89.0
	1:16	0.37	0.38	97.0
	Нет	11.26	11.26	
3	1:2	5.76	5.63	102.4
	1:4	2.76	2.81	97.9
	1:8	1.55	1.41	110.0
	1:16	0.77	0.70	109.5
	Нет	11.26	11.26	

10. ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены когда процедура анализа проходит с полным пониманием вкладыша инструкции и при соблюдении профессиональной лабораторной практики. Любое неправильное обращение с образцами или изменен или этой процедуры анализа может повлиять на результаты.

10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,25 мг/мл) и триглицериды (до 7,5 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

10.3 Хук-эффект высокой дозы

Не было замечено такого влияния.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сыровоточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



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