

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

3725-300, Testosterone Test System

Каталог. № : 3725-300

Методика от 03-20-2012

Количество : 96

Версия 4

Производитель: Monobind (США)



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

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Общего Тестостерона в человеческой сыворотке или плазме.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Тестостерон (17 α -гидрокси-4-андростен-3-он), это С19 стероид, один из наиболее сильных естественных секретируемых андрогенов. У здоровых зрелых мужчин тестостерон секретируется в основном яичками, и только незначительное количество поступает в результате внешнего превращения 4-андростен-3, 17-диола (ASD). У взрослых женщин показано, что более 50% сывороточного тестостерона приходится на внешнее превращение ASD, секретируемого надпочечниками и яичниками, а оставшаяся часть – на прямую секрецию тестостерона этими железами.

У мужчин тестостерон в основном секретируется интерстициальными клетками Лейдига, и яичками, и регулируется гормоном, стимулирующим интерстициальные клетки (ГСИК, ICSH), или лютеинизирующим гормоном (LH, ЛГ) аденогипофиза (эквивалент ICSH у женщин). Тестостерон отвечает за развитие вторичных половых признаков, таких как дополнительные половые органы, простата, семенные пузырьки и рост волос на лице, в паховой и лобковой области. Определение тестостерона очень важно при оценке гипогонадных состояний. Повышенный уровень тестостерона у мужчин выявляется при полной андрогенной резистентности (синдром тестикулярной феминизации). Частыми причинами снижения уровня тестостерона у мужчин являются: гипогонадизм, удаление яичка (орхиэктомия), эстрогеновая терапия, синдром Клайнфелтера, гипопитуитаризм и цирроз печени.

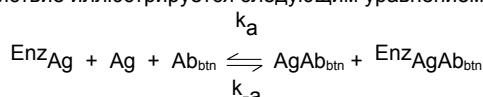
У женщин в норме уровень тестостерона значительно ниже чем у здоровых мужчин. Тестостерон у женщин происходит из трех источников. В небольших количествах он секретируется надпочечниками и яичниками, и у здоровых женщин 50-60% суточной продукции тестостерона приходится на внешний метаболизм прогормона, главным образом андростендиона. Частыми причинами повышения уровня тестостерона у женщин являются: поликистоз яичников (синдром Штейна - Левентала), опухоли яичников, опухоли надпочечников и гиперплазия надпочечников. Вирилизация у женщин ассоциирована с введением андрогенов и эндогенной гиперпродукцией тестостерона. Предполагается наличие корреляции между уровнем тестостерона в сыворотке и степенью вирилизации у женщин, хотя у приблизительно 25% женщин с различной степенью вирилизации уровень тестостерона находится в диапазоне нормальных значений тестостерона для женщин.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Конкурентный иммуноанализ (тип 7):

Настоящие реагенты, требующиеся для твердофазного иммуноферментного анализа, включают антитела, конъюгат фермента с антигеном и нативный антиген. При смешивании биотинилированных антител, конъюгата фермент-антиген и нативного антигена, содержащегося в сыворотке, происходит конкуренция между нативным антигеном образца и конъюгатом фермент-антиген за ограниченное число иммобилизованных сайтов связывания.

Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



Ab_{btin} = биотинилированные антитела (постоянное количество)

Ag = нативный антиген (переменное количество)

EnzAg = конъюгат фермент-антиген (постоянное количество)

$\text{AgAb}_{\text{btin}}$ = комплекс антиген-антитело

$\text{EnzAgAb}_{\text{btin}}$ = комплекс конъюгат - антитела

k_a = константа скорости ассоциации

k_{-a} = константа скорости диссоциации

$K = k_a / k_{-a}$ = константа равновесия

Происходит реакция между биотином, связанным с антителами и стрептавидином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Это позволяет отделить фракцию, связавшуюся с антителами, при декантации или аспирации.

$\text{AgAb}_{\text{btin}} + \text{EnzAgAb}_{\text{btin}} + \text{стрептавидин}_{\text{сw}} \Rightarrow$ иммобилизованный комплекс

стрептавидин_{сw} = стрептавидин, иммобилизованный в лунках

Иммобилизованный комплекс = «сэндвич» комплекс, связанный с твердой фазой (поверхностью лунок)

Активность фермента во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация в образцах.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

- A. Калибраторы тестостерона - 1 мл/флакон - значки A-G**
7 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями тестостерона 0 (A), 0.1 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.5 (E) и 5.0 (F) и 12.0 (G) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.
Концентрации стандартов могут быть выражены в молях (нмоль/л), умножением на коэффициент 3.47. Например: 1 нг/мл x 3.47 = 3.47 нмоль/л
- B. Конъюгат фермент-тестостерон – 1.0 мл/флакон - значок E**
Один флакон, содержащий конъюгат тестостерона (аналог) с пероксидазой хрена (HRP) в белковом стабилизирующем растворе, с зеленым красителем. Хранить при 2-8°C.
- C. Буфер Стероидного конъюгата - 7.0 мл/флакон – значок B**
Один флакон, содержащий буфер, красный краситель, консерванты и ингибиторы связывающего белка. Хранить при 2-8°C.
- D. Биотинилированный тестостерон, 6.0 мл/флакон, значок V**
Один флакон, содержащий биотинилированные антитела к тестостерону, очищенные конъюгированные кроличьи IgG в буфере, желтый краситель, консервант. Хранить при 2-8°C.
- E. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок J**
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запаянный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- F. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок D**
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.
- G. Субстрат A - 7 мл/флакон - значок S^A**
Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.
- H. Субстрат B - 7 мл/флакон - значок S^B**
Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- I. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок STOP**
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.
- J. Инструкция к набору.**

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

Замечание 3: Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозаторы на 10, 50 и 100 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Диспенсеры переменного объема (200–1000 мкл) для конъюгата
4. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
5. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
6. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
7. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
8. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
9. Таймер

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*
Не для внутреннего или наружного использования на людях
или животных**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служит сыворотка крови, плазма. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.020 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

- Рабочий раствор Ферментного конъюгата** – стабилен 1 год. Отберите точно 0.7 мл конъюгата фермент-тестостерон и внесите во флакон, содержащий буфер для разведения конъюгата тестостерона. Хранить при 2-8°C.
- Буфер для промывок**
Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.
- Рабочий субстратный раствор**
Смешайте Субстраты, вылив содержимое коричневого флакона с Субстратом А во флакон Субстрат В. Закройте смесь желтой крышкой для легкой идентификации. Перемешайте смесь и подпишите флакон «Рабочий раствор субстрата». Раствор хранится при 2-8 °C.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

- Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
- Добавьте по 0.010 мл (10 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
- Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку (см. раздел "Приготовление реагентов").
- Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
- Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) конъюгата биотин-тестостерон в каждую лунку.
- Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.

- Накройте микропланшет пластиковой пленкой и инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
- Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
- Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
- Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводится при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

Замечание: Образцы с концентрацией выше 12 нг/мл необходимо развести, в 5 и/или в 10 раз, стандартом «0» или женской сывороткой с известной низкой концентрацией тестостерона.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации тестостерона в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

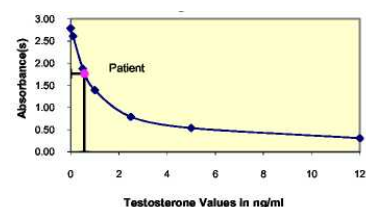
- Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
- Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации тестостерона в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
- Проведите оптимальную калибровочную кривую.
- Определите концентрации тестостерона в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 1.764 пересекает стандартную кривую при 0.57 нг/мл (см. рис. 1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	2.780	2.787	0
	B1	2.794		
Калибратор В	C1	2.576	2.611	0.1
	D1	2.646		
Калибратор С	E1	1.789	1.877	0.5
	F1	1.965		
Калибратор D	G1	1.391	1.392	1.0
	H1	1.393		
Калибратор E	A2	0.780	0.788	2.5
	B2	0.796		
Калибратор F	C2	0.530	0.538	5.0
	D2	0.547		
Калибратор G	E2	0.301	0.308	12.0
	F2	0.314		
Контроль 1	G2	1.040	0.760	1.61
	H2	1.045		
Образец	A3	1.751	1.764	0.57
	B3	1.778		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1



11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Калибратора 0 нг/мл ≥ 1.3
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
4. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
5. Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
6. Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
7. Плохая промывка ячеек может приводить к невозможным результатам.
8. Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
9. Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
10. Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
11. Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
12. Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных Monobind Inc., может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

1. **Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
2. Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализам.
3. Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
4. **Производитель не несет ответственности** за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
5. Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции, ожидаемые значения при использовании данного метода приведены в таблице 1:

ТАБЛИЦА 1

Ожидаемые значения для тестостерона, нг/мл

Мальчики до полового созревания	0.1-3.7
Мужчины	2.5-10.0
Женщины	0.2-0.95

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Низкий	22	1.63	0.16	9.8 %
Нормальный	22	9.14	0.44	4.8 %
Высокий	22	14.22	0.79	5.6 %

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Низкий	24	1.72	0.16	9.1 %
Нормальный	24	7.06	0.69	9.7 %
Высокий	24	13.08	1.03	7.9 %

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях в течение 10 дней.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 0.576 пг. Это эквивалентно образцу с концентрацией 0.0576 нг/мл для данного набора. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (мкг/дл) плюс 2σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным хемилюминесцентным методом. Использовались образцы с низким, средним и высоким содержанием тестостерона (диапазон значений 0.29-21.9 нг/мл). Общее число образцов было 58. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для данного метода Testosterone EIA в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	3.12	$Y = -0.265 + 0.944(x)$	0.985
Метод сравнения	3.02		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Перекрестные реакции антител к тестостерону с различными веществами оценивались добавлением влияющих веществ в сыворотку в различных концентрациях. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой влияющего вещества и дозой тестостерона, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Перекрестная реактивность
Тестостерон	1.0000
Андростенедион	0.0009
Дигидротестостерон	0.0178
Кортизон	<0.0001
Кортикостерон	<0.0001
Кортизол	<0.0001
Спиrolактон	<0.0001
Прогестерон	<0.0001
17 α -ОН Прогестерон	<0.0001
DHEA-S	<0.0001
Эстрадиол	<0.0001
Эстрон	<0.0001
Эстриол	<0.0001
Гемолиз	<0.0001
Краснуха	<0.0001
Липемия	<0.0001



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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»