

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

CAN-TE-300, Testosterone

Каталог. № : **CAN-TE-300**
Производитель: **Diagnostics Biochem
Canada Inc., (Канада)**

Методика от **14-02-2011**
Версия **5.0.1**



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

Только для исследовательских целей. Не для использования в диагностических процедурах

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения Тестостерона в слюне человека методом иммуноферментного анализа.

Только для исследовательских целей. Не для использования в диагностических процедурах.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на иммуноферментном анализе с использованием конкурентного связывания. Немеченый антиген (присутствующий в образцах, контролях и стандартах) и меченый ферментом антиген (конъюгат) во время инкубации конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. Затем, после промывки, добавляется ферментный субстрат. Энзиматическая реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора. Интенсивность окрашивания, сформировавшегося в ходе энзиматической реакции, обратно пропорциональна концентрации свободного тестостерона в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация свободного тестостерона в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Тестостерон – это С-19 стероид, секретируемый яичками и корой надпочечников у мужчин и корой надпочечников и яичниками у женщин. Тестостерон также продуцируется периферическими тканями из андростенедиона, этот путь имеет низкое физиологическое значение у мужчин, однако у женщин примерно половина циркулирующего тестостерона имеет именно это происхождение. Измерения тестостерона в основном используются для клинической оценки гипогонадизма у мужчин и гиперандрогенных состояний у женщин.

Циркулирующий в кровотоке тестостерон связан с тремя белками: секс гормон связывающий глобулин (44-78%), альбумин и кортизол связывающий глобулин. И только около 2-3% всего циркулирующего тестостерона остается в несвязанном, или свободном, состоянии. Не смотря на то, что исследования еще ведутся, большинство ученых принимают определение свободного тестостерона как измерение биологически активной фракции. Рекомендуются определение свободного тестостерона из-за отсутствия влияния, оказываемого различными транспортными белками при определении общей концентрации тестостерона.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток, с высоким и низким значениями, должны быть включены в каждую постановку, для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.

4. Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо одевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроль должен быть включен в каждую постановку. Его значение, полученное при тестировании, должно соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученный для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в виде окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения свободного тестостерона в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения свободного тестостерона в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тиомерозал, не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
3. Только калибратор А может использоваться для разведения высоких образцов слюны. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
4. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Сыворотка человека, которая может быть использована при приготовлении стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМВ может быть канцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 1 мл слюны. Соберите 2-3 мл слюны в чистую стеклянную пробирку перед едой, питьем или чисткой зубов. Просто сполосните рот водой перед забором. Не использовать образцы с кровью. Храните при 4 °С не более 24 часов или при -10 °С или ниже, если анализ будет проводиться позже. Считайте все образцы крови человека потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦА

1. Образцы центрифугировать. Супернатанты переместить в чистые пробирки.
2. Пробирки с супернатантом поместить на водяную баню и нагревать при температуре 60-70 °С в течение 1 часа.
3. Оставить нагретые образцы для остывания до комнатной температуры перед началом анализа.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Высокоточные пипетки на 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Шейкер
5. Центрифуга
6. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более*(См. шаг 13 процедуры)
7. Водяная баня

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими антителами к тестостерону (с «ломаемыми» стрипами) - готовый к использованию.

Содержит: 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый поликлональными антителами в закрываемом пакете с осушителем. Хранение: охлажденным при 2 – 8°С
Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

2. Концентрат конъюгата тестостерона с биотином – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат тестостерон-биотин в белковом буфере с консервантом, не содержащим меди.
Объем: 300 мкл во флаконе
Хранение: охлажденным при 2 – 8°С
Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести в соотношении 1:50 в рабочем Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Концентрат конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (стрептавидин/HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат Стрептавидин-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим меди.
Объем: 400 мкл во флаконе
Хранение: охлажденным при 2 – 8°С
Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести в соотношении 1:50 в рабочем буфере Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

4. Калибраторы тестостерона слюны - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих тестостерон в буфере на основе белка, с консервантом, не содержащим меди. Приготовлены добавлением известных количеств тестостерона в сыворотку.
*В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Калибратор	Концентрация (нг/мл)	Объем/в пробирке
Калибратор А	0	4.0 мл
Калибратор В	2	1.0 мл
Калибратор С	10	1.0 мл
Калибратор D	50	1.0 мл
Калибратор E	200	1.0 мл
Калибратор F	800	1.0 мл

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С
Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия стандарты должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

5. Контроли – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие тестостерон в буфере на основе белка, с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением определенного количества тестостерона в сыворотку. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.

Объем: 1.0 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2–8 °С

Стабильность: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия стандарты должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

6. Рабочий буфер Биотинового Конъюгата - готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 13 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2–8 °С

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

7. Рабочий буфер HRP Конъюгата - готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 20 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2–8 °С

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

8. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 бутылочка, содержащая буфер с неонным детергентом и консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 50 мл в бутылочке.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера в 450 мл воды.

9. Субстрат ТМБ – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

10. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий 1М серной кислоты.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Подготовка образцов:

Центрифугирование и нагревание при 60-70 °С в течение 1 часа.

Все реагенты должны нагреться до комнатной температуры перед использованием.

Стандарты, контроли и образцы должны анализироваться в дублях.

Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата тестостерон-биотин, стрептавидин-HRP конъюгата и промывочного буфера.
2. Выберите необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы снова верните в пакет с осушителем и запечатайте.
3. Внесите по 100 мкл каждого калибратора, контроля и образца в соответствующим образом помеченные ячейки, в дублях.
4. Внесите по 100 мкл конъюгата тестостерон-биотин во все ячейки (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).
5. Инкубируйте 1 час при КТ (приблизительно 200 грм).
6. Промойте ячейки 5 раз, используя по 300 мкл разведенного буфера для промывок на ячейку, а затем постучите микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедитесь, что ячейки сухие (рекомендуется использовать автоматическое промывающее устройство).

- Внесите с одинаковой скоростью по 150 мкл рабочего раствора конъюгата стрептавидин-HRP в каждую ячейку.
- Инкубируйте в течение 30 минут при КТ.
- Промойте лунки опять, как указано в шаге 6.
- Пипетируйте 150 мкл ТМБ субстрата в каждую лунку через определенные интервалы.
- Инкубировать на шейкере 10-15 минут при КТ (или до тех пор, пока калибратор А не достигнет темно-синего цвета).
- Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки, в той же последовательности и с той же скоростью, как и в шаге 10.
- Определимте оптическую плотность ячеек с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм в течение 20 минут после внесения стоп-раствора.

* Если ОП превышает верхний предел определения ридера или невозможно использовать фильтр 450 нм, можно проводить измерения при 405 нм или 415 нм. При этом ОП будет ниже, но это не повлияет на конечные результаты анализа.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

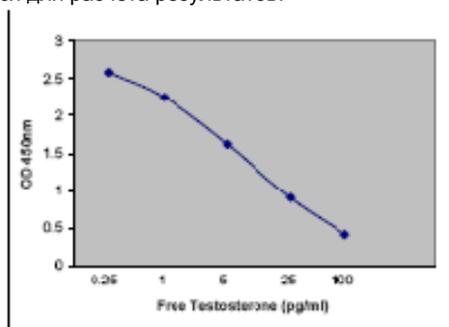
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого стандарта.
- Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности стандартов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
- Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
- Если образец имеет значение, больше, чем 800 пг/мл, его необходимо развести с калибратором А с коэфф. разведения не больше, чем 1:8. Результат умножить на коэфф. разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Калибратор	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (пг/мл)
A	2.739	2.591	2.665	0
B	2.385	2.338	2.362	2
C	1.857	1.887	1.872	10
D	0.987	1.027	1.007	50
E	0.497	0.495	0.496	200
F	0.291	0.273	0.282	800
неизвестный	1.086	1.077	1.082	43.7

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность:

Нижний предел обнаружения рассчитан исходя из калибровочной кривой вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого калибратора (калибратора А), измеренного 10 раз.

Чувствительность метода dbc Testosterone Saliva ELISA составила **1.0 пг/мл**.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы на перекрестную реактивность с помощью данного метода, при 100% перекрестной реактивности для свободного тестостерона:

Стероид	Перекрестная реактивность, %
Тестостерон	100
5α-ДГТ	5.2
Андростенедион	1.4
Андростанедион	0.8

Прогестерон	0.5
Андростерон	0.1

Кроме того, следующие перечисленные соединения были протестированы и перекрестная реактивность составила менее 0.1%: альдостерон, андреностерон, холестерол, кортикостерон, дегидроэпиандростерон, дегидроэпиандростерон сульфат, эпиандростерон, 17β-эстрадиол, эстриол и прегненолон.

Воспроизводимость внутри серии:

3 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	14.05	1.00	7.1
2	38.19	1.30	3.4
3	122.81	8.19	6.7

Воспроизводимость между сериями:

3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 4 недель. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	11.03	1.08	9.8
2	47.24	3.32	7.0
3	122.79	11.23	9.1

Восстановление:

Образцы были приготовлены добавлением определенного количества тестостерона к 3 образцам слюны пациента. Результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Восстановление, %
1 обогащенный	5.21	-	-
+ 50 (5:1)	15.89	14.2	112
+200 (5:1)	50.82	44.2	115
+800 (5:1)	154.48	164.2	94
2 обогащенный	32.50	-	-
+ 50 (5:1)	34.86	36.0	97
+200 (5:1)	57.39	66.0	87
+800 (5:1)	165.73	186.0	89
3 обогащенный	52.57	-	-
+ 50 (5:1)	53.67	52.06	103
+200 (5:1)	85.77	82.06	105
+800 (5:1)	179.00	202.06	89

Линейность:

Три образца слюны пациента были разведены калибратором А. Результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Восстановление, %
1	154.48	-	-
1:2	82.44	77.24	107
1:4	39.38	38.62	102
1:8	23.14	19.31	120
2	165.73	-	-
1:2	88.74	82.87	107
1:4	50.47	41.43	122
1:8	16.95	20.72	82
3	188.75	-	-
1:2	104.45	94.38	111
1:4	49.24	47.19	104
1:8	20.31	23.59	86

Ожидаемые нормальные значения

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений. Исследования ожидаемого диапазона нормальных значений у практически здоровых людей дали следующие результаты (в пг/мл):

Группа	N	Диапазон
Мужчины	40	38-120
Женщины	41	5-32

Сравнительное изучение образцов с экстракцией и без неё:

Данный метод оценивался следующим образом:

- С предшествующей экстракцией.
- С предшествующим нагреванием в течение 1 часа при 60-70 °C. результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	С экстракцией	С нагреванием
1	37	44
2	57	52
3	35	35
4	42	36
5	44	41
6	35	32
7	37	33
8	41	35
9	49	51
10	45	53
11	37	19
12	22	25
13	11	9.59
14	55	52.17
15	33	33.08

Данные демонстрируют высокую согласованность между двумя методами, с корреляцией $r = 0.8747$.



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