

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТЕСТОСТЕРОНА

CAN-fTE-260, Free Testosterone

Каталог. № : **CAN-fTE-260**
Производитель: **Diagnosics Biochem
Canada Inc., (Канада)**

Методика от **26-10-2010**
Версия **4.0**



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

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения свободного тестостерона в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа.

Только для диагностики *in-vitro*.

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.

В данном методе **dbc free testosterone** используются высоко специфичные кроличьи поликлональные антитела к тестостерону при низкой способности к связыванию ($K_{eq} \times$ концентрацию) для того, чтобы нарушение равновесия тестостерон-белок было минимальным. Другие компоненты данного набора также оптимизированы для сохранения исходной концентрации свободного тестостерона.

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 (60-80%), альбумин и кортизол связывающий глобулин. И только около 1-2% 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. Рекомендуется 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 надевать 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. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал, не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Образцы с результатами выше 100 нг/мл не разводите. Разбавление изменит равновесие между свободным тестостероном и сывороточными белками.
5. 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 0.1 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. 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

Предварительная обработка образца не требуется, так как данный тест является прямой системой.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Высокоточные пипетки на 25, 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Инкубатор на 37 °С
5. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более*(см шаг 11 процедуры).

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими антителами к свободному 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 свободного тестостерона с пероксидазой хрена (свободный тестостерон/HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат свободный тестостерон-HRP 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 буфере (например, 40 мкл концентрата конъюгата в 2 мл рабочего буфера). При использовании всего микроплшета разведите 240 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Стандарты свободного тестостерона - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих свободный тестостерон в буфере на основе сыворотки человека, с консервантом, не содержащим меди. Приготовлены добавлением известных количеств тестостерона в сыворотку, эквивалентных приблизительно 0, 0.25, 1.02, 5.5, 25 и 125 пг/мл свободного тестостерона.

* В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Стандарт	Концентрация (пг/мл)	Объем/в пробирке
Стандарт А	0	0.5 мл
Стандарт В	0.25	0.5 мл
Стандарт С	1.02	0.5 мл
Стандарт D	5.5	0.5 мл
Стандарт E	25	0.5 мл
Стандарт F	125	0.5 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.

4. Контроли – готовы к использованию.

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

Объем: 0.5 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.

5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 бутылочка, содержащая буфер с неионным 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.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

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

Объем: 15 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

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

7. 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.

8. 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:

Нет

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 свободного тестостерона-HRP и промывочного буфера.
2. Выберите необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы снова верните в пакет с осушителем и запечатайте.
3. Внесите по 25 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующим образом помеченные ячейки, в дублях.
4. Внесите по 100 мкл рабочего раствора конъюгата во все ячейки (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).
5. Аккуратно перемешайте в течение 10 секунд.
6. Инкубируйте 1 час при 37 °С.
7. Промойте ячейки 3 раза, 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).
8. Внесите с одинаковой скоростью по 150 мкл раствора ТМБ субстрата в каждую ячейку.
9. Инкубируйте в течение 10 – 15 минут при 37 °С (или до тех пор, пока стандарт А не достигнет темно-голубого цвета, для получения желаемой ОП).
10. Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки, в той же последовательности и с той же скоростью, как и в шаге 8.
11. 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

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого стандарта.
2. 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

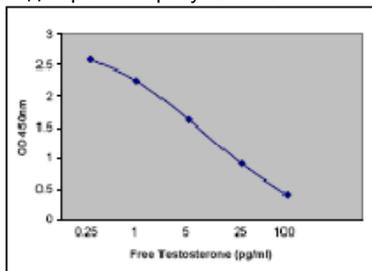
- программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
 - Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (пг/мл)
A	2.100	2.013	2.057	0
B	1.463	1.506	1.485	0.25
C	0.908	0.922	0.915	1.02
D	0.472	0.462	0.467	5.5
E	0.277	0.254	0.266	25
F	0.153	0.146	0.150	125
неизвестный	0.464	0.458	0.461	5.7

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 стандарта (стандарт А), измеренного 10 раз. Чувствительность метода dbc Direct Free Testosterone ELISA составила **0.17 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
5 α -ДГТ	5.2
Андростенедион	1.4
андростенедиол	0.8
прогестерон	0.5
андростерон	0.1

Кроме того, следующие перечисленные соединения были протестированы и перекрестная реактивность составила менее 0.1%: альдостерон, андростерон, холестерол, кортикостерон, дегидроэпиандростерон, дегидроэпиандростерон сульфат, эпиандростерон, 17 β -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	1.17	0.20	17.0
2	15.96	0.79	4.9
3	62.46	2.95	4.7

Воспроизводимость между сериями:

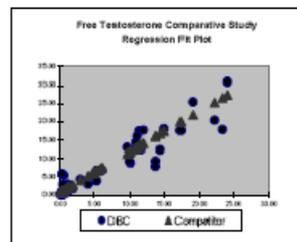
3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 2 недель. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	0.97	0.12	12.4
2	25.81	1.36	5.3
3	75.81	6.66	8.8

Сравнительные исследования

Данный метод dbc Direct Free Testosterone ELISA (метод y) был сравнен с другим конкурентным РИА методом (набор x). При анализе 61 образца сывороток была получена следующая линейная регрессия:

$$Y (\text{dbc}) = 1.0137x (\text{конкурентный}) + 0.6404, r=0.89$$



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	медиана	Центральный 95% интервал	Диапазон абсолютных значений
Мужчины	71	12.3	4.25-30.37	3.84-34.17
Женщины	60	1.03	0.04-4.18	0.01-7.01

ВЛИЯНИЕ СЕКС ГОРМОН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА (SHBG)

Целью данного исследования было оценить возможный эффект, оказываемый связыванием SHBG с конъюгатом свободный тестостерон-пероксидаза хрена. В очищенную пулированную человеческую сыворотку добавляли точноизвестные количества SHBG, в диапазоне концентраций 6-200 мкг/мл и затем анализировали с помощью данного dbc Direct Free Testosterone ELISA метода. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

Добавленный SHBG	ОП 450 нм	соотношение В/В ₀ (%)
0 мкг/мл	2.34	100.0
6.25 мкг/мл	2.33	99.7
12.5 мкг/мл	2.27	97.2
50 мкг/мл	2.14	91.6
200 мкг/мл	2.10	89.7

Результаты показали значение связывания около 90-100% В/Во (Vo=ненасыщенная сыворотка), даже при уровне SHBG выше нормы (0.5-5 мкг/мл). Можно сделать вывод о том, что не наблюдается значительного влияния SHBG на результаты тестирования методом dbc Direct Free Testosterone Direct ELISA.

ВЛИЯНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА (HSA)

Целью данного исследования было оценить возможный эффект, оказываемый сывороточным альбумином человека (HSA) на результаты анализа. HSA был добавлен в три образца сывороток пациентов в концентрациях 1.25, 2.5 и 5.0 г/дл. Все образцы были проанализированы данным методом Direct dbc Free Testosterone ELISA. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

образцы	добавленный HSA, г/дл			
	0	1.25	2.5	5.0
1	0.52	0.34	0.54	0.53
2	15.8	14.2	12.5	10.9
3	26.2	23.0	21.0	18.6

Результаты показали отсутствие значительного влияния HSA на результаты тестирования трех образцов сывороток пациентов.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черногола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com