

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТЕСТОСТЕРОНА

EIA-2924, Free Testosterone ELISA

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

Методика от 06-2015
Версия 1.0



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

1. 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 ограниченное количество 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 ПГССГ (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

3.1 Поставляемые в наборе реагенты и материалы

1. **Стандарты (Стандарт 0-5)**, 6 флаконов по 1 мл каждый.
2. **Контроли** (Контроль А и Контроль В), 2 флакона 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 антителом Ианти-тестостерона.
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, 2 флакона по 25 мл. 0.2 М Фосфатный Буфер, pH 7.4

3.2 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор

- Дистиллированная вода.

3.3 Вспомогательные материалы и оборудование

- Автоматический дозатор.
- Микропланшетный ридер (450 нм, 620-630 нм).

Примечание

Хранить все реагенты при 2-8 °С 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.

4. 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. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Микробиологически загрязненные образцы не должны использоваться в анализе.
- Высоколипемические или гемолизованные 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.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Приготовление 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 °С.

Преобразование единиц: пмоль/л = 3.47 x пг/мл

6.2 Подготовка образца

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

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

Избегать повторного замораживания-оттаивания образцов.

Контроль готов к использованию.

6.3 Подготовка Промывочного Раствора

Перед использованием разбавить содержимое двух флаконов Промывочного Раствора дистиллированной водой до конечного объема 500 мл (для обеих пробирок 25 мл + 25 мл + 450 мл).

При меньших объемах соблюдать пропорцию разбавления 1:10.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при 2-8 °С.

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.

6.4 Процедура

Привести все реагенты к комнатной температуре, минимум 30 минут. После окончания анализа вернуть все реагенты в температуру 2-8 °С; не подвергать реагенты длительному воздействию комнатной температуры. Неиспользуемые микролуночные полоски хранить 2-8 °С.

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	
<p>Инкубировать при 37 °С в течение 1 часа. Удалить содержимое из каждой лунки; промыть лунки три раза 300 мкл разбавленного промывочного раствора. Важное замечание: во время каждого шага промывания встряхивать планшет в течение 5 секунд и удалить остатки жидкости постукиванием по столу. Автоматический вошер: при использовании автоматического вошера промывать лунки минимум 5 раз.</p>			
Раствор субстрата ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать при температуре 22-28 °С 15 мин. в темном месте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Осторожно встряхнуть микропланшет. Считать абсорбцию (E) при 450 нм относительно референтной длины волны 620-630 нм или бланка в течение 5 минут.			

7. 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.

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:

См. таблицу в оригинале инструкции.

10. ПРОДУКТИВНОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

Вариация в анализе

Вариация в анализе была определена измерением репликата (20х) трех разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариабельность в анализе составляет $\leq 8.9\%$.

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 $\leq 12.4\%$.

10.2 Чувствительность

Самая низкая определяемая концентрация свободного тестостерона от нулевого стандарта составляет 0,04 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:

См. таблицу в оригинале инструкции.

10.4 Корреляция

Набор свободного тестостерона был сравнен с имеющимся на рынке набором свободного тестостерона РИА. Образцы 51 сыворотки исследовались обеими системами анализа.

Линейная регрессия была определена следующим образом:

$$y = 1,81x - 1,71$$

$$r^2 = 0,94$$

11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться с соблюдением местных требований.

12. ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

13. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Возможные причины ошибок/Рекомендации по их устранению

Нет колориметрической реакции

- Отсутствие реакции после добавления конъюгата
- Загрязнение конъюгатов и/или субстрата
- Ошибки в проведении процедуры (например, ошибочное пипетирование реагентов в неверном порядке или не из того флакона, и т.п.)

Слишком слабая реакция (очень низкие OD)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Слишком короткое время инкубации, температура инкубации слишком низкая

Слишком сильная реакция (очень высокие OD)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Слишком длительное время инкубации, температура инкубации слишком высокая
- Низкое качество воды для промывочного буфера (низкий уровень деионизации)
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Непонятные результаты

- Загрязнение пипеток, наконечников или ёмкостей
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Слишком высокое значение CV % внутри анализа

- Реагенты и/или полоски не приведены к комнатной температуре перед использованием
- Промывочное устройство не работает надлежащим образом (совет: почистить головку для промывки)

Слишком высокое значение CV % между анализами

- Условия инкубации не постоянны (время, температура)
- Контроли и образцы не добавлялись с одинаковым промежутком времени (с одинаковыми интервалами) (проверить порядок пипетирования)
- Человеческий фактор



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