



Набор для определения свободного ТЕСТОСТЕРОНА

Кат. № : 102-2924
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 01-2008

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

DRG FREE TESTOSTERONE ELISA KIT - иммуноферментный анализ для количественного определения в диагностике *in vitro* свободного тестостерона в сыворотке или плазме.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Тестостерон свободный ELISA используется для определения свободного тестостерона методом основанным на конкурентном связывании. Микротитровальные лунки покрыты антителами к уникальным антигенным участкам молекул тестостерона. Образцы пациентов в аликвотах, содержащие эндогенный свободный тестостерон, инкубируются в лунках с конъюгатом, который представляет собой антисыворотку свободного тестостерона конъюгированную пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат вымывается дистиллированной водой. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации свободного тестостерона в образце. После добавления раствора субстрата, интенсивность проявляемого окрашивания пропорциональна концентрации свободного тестостерона в образце пациента.

Тестостерон в крови связан с SHBG (60%) и в меньшем количестве с другим протеином. Только измерение свободного тестостерона (<1% общего тестостерона) позволяет определить биологически активный гормон.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.
2. Не существует методов тестирований, на 100% гарантирующих отсутствие компонентов вируса Гепатита Б, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV), или других инфекций. Поэтому все продукты, содержащие компоненты человеческой крови должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Следовательно, при работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности, установленные в лабораторной практике.
3. Избегайте контакта кожи со Стоп-раствором – 0,15mol/L H₂SO₄. Это может вызвать раздражения и ожоги
4. Немедленно после использования закройте реагенты крышками. Не путайте крышки от реагентов.
5. Растворы, содержавшие добавки или консерванты, такие как азид соды, не должны использоваться в ферментной реакции.
6. Не используйте в исследовании компоненты из наборов разных партий.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержание набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 стрипов, 96 лунок. Лунки покрыты анти-тестостерон антителом.
2. **Стандарты (0-5)**, 6 флаконов по 1 мл, готовы к использованию (0 - 0.2 -1.0 - 4.0 - 20.0 - 100.0 пг/мл)
3. **Ферментный конъюгат** (1 флакон), 22 мл, готов к использованию, конъюгированный с пероксидазой хрена.
4. **Раствор ТМВ субстрата** (1 флакон), 14мл, готов к использованию H₂O₂ / ТМВ 0.25 г/л. *Избегайте контакта с кожей.*
5. **Стоп-раствор** (1 флакон), 14 мл, готов к использованию, серная кислота, H₂SO₄ 0.15Моль.

Избегайте контакта со стоп-раствором. Он может причинить раздражение кожи и ожоги.

4.1.1 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор:

1. Микроплашечный ридер(450±10 нм).
2. Точные микропипетки с одноразовыми наконечниками.
3. Абсорбирующая бумага.
4. Дистиллированная вода.
5. инкубатор на 37°C.

4.2 Хранение и стабильность набора

При хранении при 2 - 8°C, невскрытые реагенты стабильны до даты срока годности. Не использовать реагенты после истечения срока годности.

Ферментный конъюгат, раствор субстрата, стандарты и нулевой стандарт хранить при т-ре 2-8С.

Открывать упаковку микротитровальных лунок после того, как он достигнет комнатной температуры и закрывать сразу же после использования.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Стандарты

Перемешивать перед использованием 5 минут с помощью вращающегося миксера.

Примечание: После вскрытия стандарты стабильны 6 месяцев при 2-8°C.

4.4 Утилизация набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. раздел 13 в оригинале инструкции).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или плазма (ЭДТА-, гепарин-, или цитрат плазмы) могут использоваться в данном исследовании.

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Внимание: образцы, содержащие азид натрия не должны использоваться в анализе.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь стандартным методом венепункции, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

Плазма:

Собрать всю кровь в центрифужные пробирки с анти коагулянтом и сразу же после забора центрифугировать.

5.2 Хранение образцов

Если образцы не используются в день забора, они должны быть заморожены до -20°C для хранения в течении более длительного периода. Замораживать только один раз. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

В случае если в исходном анализе концентрация в образце больше чем в наивысшем стандарте, образцы можно разводить с нулевым стандартом и анализировать повторно, как описано в Процедура Анализа.

Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимание данный фактор разведения образцов.

Например:

- а) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотки + 90 мкл Нулевого стандарта (тщательно перемешать).
- б) разведение 1:100: 10 мкл раствор а) 1:10 + 90 мкл Нулевой стандарт (тщательно перемешать)

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

- Все реагенты и образцы перед началом исследования должны иметь комнатную температуру. Все реагенты должны быть перемешаны без образования пены.

- После начала исследования все шаги должны быть завершены без остановок
- Для каждого образца, реагента и стандарта необходимо использовать новые одноразовые наконечники пипеток.
- Абсорбция - это функция, линейно пропорциональная инкубационному времени и температуре. До начала исследования рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить в держателе необходимые лунки, и т.д. Этим Вы обеспечите равное время для каждого раскапывания без остановок.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Каждая процедура должна включать стандартную кривую.

1. Установите необходимое количество лунок в держателе.
2. Раскапать по **20 мкл** каждого из стандартов, контролей и образцов новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки. Оставить лунку А1 пустой для бланка субстрата.
3. Раскапать **200 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку, кроме лунки бланка. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. Очень важно полностью перемешать на данном этапе.
4. Инкубируйте в течение **60 мин** при 37°C.
5. Резко встряхните содержимое лунок. Промыть лунки 2 раза дистиллированной водой (300 мкл/лунку). Резко постучите плашкой об абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки влаги.
Важно: Точность и чувствительность данного анализа зависит от четко выполненной процедуры промывки!
6. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубировать в течение **15 минут** при комнатной температуре в темноте.
8. Остановить ферментную реакцию добавлением **100 мкл** Стоп-раствора в каждую лунку.
9. Читать оптическую плотность при **450±10 нм** микропланшетным ридером **в течение 10 минут** после добавления Стоп-раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения абсорбции для каждого стандарта, контроля и образца пациента.
2. Постройте стандартную кривую соотношением средней абсорбции (Y) каждого референс-стандарта к соответствующей концентрации (X) в нг/мл.
3. Используя среднюю абсорбцию каждого образца, определите соответствующую величину простой интерполяцией от этой стандартной кривой, при необходимости умножая на коэффициент разведения.
4. Автоматический метод: компьютерные программы, использующие кубический сплайн, 4 PL (4 параметра материально-технического обеспечения) или логит преобразование.
5. Концентрацию образцов можно считывать непосредственно со стандартной кривой. Образцы с концентрацией, превышающей самый высокий стандарт, необходимо разводить еще раз. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимание данный фактор разведения.

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные и ненормальные значения.

	Средн.	Средн. ± 1 СО пг/мл	Диапазон пг/мл
Здоровые мужчины	14	13 ± 7	4,5-42
Женщины: Овуляция	1.3	1.4 ± 0.9	НО – 4.1
Оральные контрацептивы	0.9	1.1 ± 0.6	0.3 – 2.0
Постменопауза	0.8	0.9 ± 0.5	0.1 – 1.7

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Значения и диапазоны, указанные в сертификате контроля

качества всегда соответствуют данному лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

Аналит	Кросс-реактивность
Тестостерон	100.0 %
DHT	0.006 %
Андростенедион	0.0005 %
Андростерон	0.0 %
DHEA-S	0.0 %
Кортизол	0.0%
Кортизон	0.0 %
17α Эстрадиол	0.0 %
Эстрон	0.0 %
Преднизон	0.0 %
17α Этинилэстрадиол	0.0 %
Норгестрел	0.0 %

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон данного анализа варьируется от 0 – 100 пг/мл.

9.2 Специфичность антител (кросс-реактивность)

Кросс реакция антител рассчитана при 50% по Абрахаму и указана в таблице:

9.3 Аналитическая чувствительность

Минимально определенная концентрация свободного тестостерона может быть определена из нулевого стандарта и составляет 0,002 пг/мл при границе достоверности 95%.

9.4 Точность

9.4.1 Вариативность внутри анализа

Была определена исходя из репликатов (16x) двух разных контрольных сывороток в одном анализе. Вариативность составила 6,4%.

9.4.2 Вариативность между анализами

Была определена исходя из репликатов трех разных контрольных сывороток двух различных партий. Вариативность составила 8%.

9.5 Соответствие с RIA (радиоиммунным анализом)

Свободный тестостерон ELISA был сравнен с другим, присутствующим на рынке аналогичным анализом. Были проанализированы 69 женских и 26 мужских образцов в обеих системах анализа.

Линейная кривая регрессии была определена как:

$$y = 0,47 x : 0,378, \quad r = 0,86$$

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97,
 г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: +38 (0342) 77 51 22
 Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
 E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com