

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТЕСТОСТЕРОНУ

3725-300, Testosterone Test System

Каталог. №: 3725-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 24-05-2019

Версія 5



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

Призначення: Кількісне визначення концентрації загального Тестостерону в людській сироватці або плазмі за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

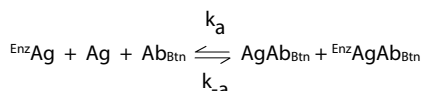
2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (тип 7):

Реагенти, що вимагаються для твердофазового імуноферментного аналізу, включають антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між нативним антигеном зразка та кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

Ag = нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

AgAb_{Btn} = комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = комплекс кон'югат - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

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

Відбувається реакція між біотином, пов'язаним з антитілами і стрептавідином, іммобілізованим в лунках мікропланшетів. Це дозволяє відокремити фракцію, пов'язану з антитілами, при декантації або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{C.W.}} \Rightarrow$ Іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{C.W.}}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках іммобілізований комплекс = "сендвіч"-комплекс, пов'язаний з твердою фазою (поверхнею лунок)

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Тестостерону – 1 мл/флакон

Сім флаконів референсної сироватки для Тестостерону з концентраціями 0 (A), 0.1 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.5 (E), 5.0 (F) та 12.0 (G) нг/мл. Зберігати при 2-8 °C. Містить консерванти. Концентрації стандартів можуть бути виражені в молях (нмоль/л) множенням на коефіцієнт 3.47.

Наприклад: 1 нг/мл x 3.47 = 3.47 нмоль/л

B. Ферментний реагент Тестостерону – 6.0 мл/флакон

Один флакон, що містить кон'югат Тестостерону (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині, з червоним барвником, консервантом та інгібіторами зв'язуючого білка. Зберігати при 2-8 °C.

C. Біотиновий реагент Тестостерону – 6.0 мл

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до Тестостерону, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °C.

D. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл стрептавідину і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C.

F. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. стабільність набору і компонентів визначені на етикетці.

Зауваження 3: Перераховані реагенти для одного 96-лунового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 10, 50 та 100 мкл з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 и 350 мкл с точністю не гірше 1.5%
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм
5. Фільтрувальний папір для просушування планшета
6. Пластикова плівка чи кришка для інкубації мікропланшета
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання
8. Таймер
9. Контрольні матеріали

5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівняваності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натще. Зберіть кров в пробірки для венепункції з червоною кришечкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірку з EDTA або гепарином для плазми. Дозвольте крові згорнутись (для сироватки). Відцентрифугуйте зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, бажано протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть бути охолоджені до 2-8 °C на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.020 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролі відповідно з низьким, нормальним і високим діапазоном для відстеження характеристик набору. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик поставлених реагентів. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або деградацію реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розведіть концентрат промивного буфера у відповідному посуді, до 1000 мл дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин - стабільний 1 рік.

Змішайте Субстрати, виливши вміст коричневого флакона з Субстратом А у флакон Субстрату В. Закрийте суміш жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть флакон «Робочий розчин субстрату». Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він синього кольору.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти та контролі повинні досягнути кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть смужки, які не використовуються, в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте по 0.010 мл (10 мкл) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 0.050 мл (50 мкл) Ферментного кон'югату Тестостерону в кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) Біотинового Реагенту Тестостерону в усі лунки.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл буфера для промивок (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів (уникайте повітряних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте лунки протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 12 нг/мл необхідно розвести в 5 або 10 разів «0» калібратором Тестостерону або жіночою сироваткою з відомою низькою концентрацією Тестостерону.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Тестостерону в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

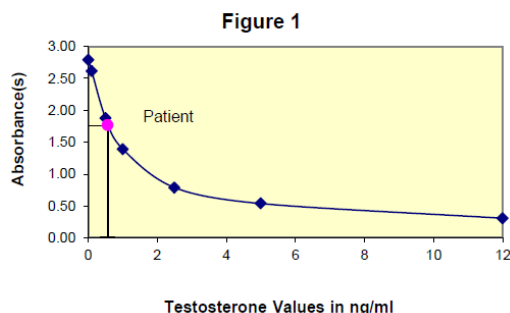
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації Тестостерону в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
- Визначте невідомі концентрації Тестостерону у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.764 перетинає стандартну криву при 0.57 нг/мл (див. мал.1)

Примітка: Програмне забезпечення для обробки даних, призначене для аналізу ІФА, може також використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.780	2.787	0
	B1	2.794		
Калібратор В	C1	2.576	2.611	0.1
	D1	2.646		
Калібратор С	E1	1.789	1.877	0.5
	F1	1.965		
Калібратор D	G1	1.391	1.392	1.0
	H1	1.393		
Калібратор Е	A2	0.780	0.788	2.5
	B2	0.796		
Калібратор F	C2	0.530	0.538	5.0
	D2	0.547		
Калібратор G	E2	0.301	0.308	12.0
	F2	0.314		
Контроль 1	G2	1.040	0.760	1.61
	H2	1.045		
Пацієнт 1	A3	1.751	1.764	0.57
	B3	1.778		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

- Оптична густина Калібратора 0 нг/мл повинна бути ≥ 1.8 .
- Чотири з шести контролів якості повинні впадати в установлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1 Якість набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.

6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедури були розроблені для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реаكتивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів. (*Boscato LM Stuart MC. Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних клінічних досліджень. Chem 1988: 3427-33*). Для діагностичних цілей слід використовувати результати цього аналізу в поєднанні з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для "нормальної" дорослої популяції, очікувані значення при використанні даного методу наведені в таблиці 1:

Таблиця 1

Очікувані значення для тест-системи Тестостерону (нг/мл)

Хлопчики до статевого дозрівання	0.1-3.7
Чоловіки	2.5-10.0
Жінки	0.2-0.95

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, тестованої популяції і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору Тестостерону всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Число, значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	22	1.63	0.16	9.8 %
Нормальний	22	9.14	0.44	4.8 %
Високий	22	14.22	0.79	5.6 %

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	24	1.72	0.16	9.1 %
Нормальний	24	7.06	0.69	9.7 %
Високий	24	13.08	1.03	7.9 %

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах на протязі 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу – 0.576 пг для даного набору. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.0576 нг/мл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним хемілюмінесцентним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом Тестостерону (діапазон значень 0.29 – 21.9 нг/мл). Загальне число зразків було 58. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	3.12	$y = -0.265 + 0.944$	0.985
Референсний	3.02	(x)	

Було знайдено лише незначне розходження даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують чудову узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин у різних концентраціях до сироваткової матриці. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність
Тестостерон	1.0000
Андростенедіон	0.0009
Дигідротестостерон	0.0178
Кортизон	<0.0001
Кортикостерон	<0.0001
Кортизол	<0.0001
Спіролактон	<0.0001
Прогестерон	<0.0001
17α-ОН Прогестерон	<0.0001
DHEA-S	<0.0001
Естрадіол	<0.0001
Естрон	<0.0001
Естріол	<0.0001
Гемоліз	<0.0001
Краснуха	<0.0001
Ліпемія	<0.0001



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

