

**Набор для определения
ТЕСТОСТЕРОНА
Testosterone ELISA KIT**

Кат. № : 104-1559
Количество : 96
Производитель : DRG (USA)

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

Методика от 08/2007
Версия 7.0

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения тестостерона в сыворотке и плазме крови.

Данный анализ предназначен только для диагностического использования in vitro.

ВСТУПЛЕНИЕ

Тестостерон (17 бета-гидрокси-4-андростерон-3-один) стероид C19 с насыщенным связью между C-4 и C-5, кетонной группой в C-3 и гидроксильной группой в бета позиции в C-17. Он имеет молекулярный вес 288,47.

Тестостерон наиболее важный андроген, секретируемый в кровь. У мужчин тестостерон первично секретируется клетками Лейдига, у женщин около 50% циркулирующего гормона образуется от периферической конверсии андростендиона, а 25% - с яичников, и 25% - адrenaльных желез.

Тестостерон отвечает за развитие вторичных половых признаков у мужчин и его измерение может быть полезным при оценке гипогонадных состояний. У женщин высокие уровни тестостерона в основном бывают при гирсутизме и вирилизации, поликистозе яичников, опухолей яичников и адrenaльной гиперплазии.

У мужчин высокие уровни тестостерона ассоциируются с гипоталамическим питуитаризмом, опухолями яичков, врожденной адrenaльной гиперплазией и раком простаты.

Низкие уровни могут быть при гипопитуитаризме, синдроме Кляйнфельтера, тестикулярной феминизации, крипторхизме и удалении яичек, ферментных дефектах и некоторых иммунных заболеваниях.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG Тестостерон ELISA, твердофазный иммуносорбентный тест базируется на принципе конкурентного связывания.

Ячейки микропланшета покрыты антителом, направленным против уникальной антигенной стороны молекулы тестостерона.

Эндогенный тестостерон образцов пациентов конкурирует с тестостероном, конъюгированным с пероксидазой конкурируют за связывание с антителом, которым покрыто дно лунок. После инкубации планшет промывается.

Количество связанного конъюгата пероксидазы обратно пропорционально концентрации тестостерона в образце. После добавления раствора субстрата интенсивность развитого окраса обратно пропорционально концентрации тестостерона в образце.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

1. Для диагностики in vitro.
2. Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
3. Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
4. Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
5. Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
6. Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
7. Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
8. Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
9. Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
10. Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток и микропланшетных ридеров.
11. Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять места лунки разных планшетов даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
12. Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.

13. Лист данных безопасности доступен по требованию.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. **Микрострипы**, 12x8 стрипов, 96 ячеек
Ячейки покрыты мышиным моноклональным анти-тестостерон антителом
2. **Стандарт (стандарт 0-6)**, 7 фл., 1 мл, готовый к использованию
Концентрации: 0-0, 2-0, 5-1-2-6-16 нг/мл
Конверсия: 1 нг/мл=3,467 нмоль/л
вмещает 0,03% Проклина 300 + 0,005% гентамицина как консервант.
3. **Энзимный конъюгат**, 1 фл., 25 мл, готовый к использованию
Тестостерон, конъюгированный с пероксидазой хрена вмещает 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,10% MIT как консерванта.
4. **Раствор субстрата** 1 фл., 25 мл, готовый к использованию.
TMB
5. **Стоп раствор**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию
Содержит H₂SO₄ 0,5M

Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать раздражения и ожоги.

6. **Раствор для промывания (40x)**, 1 фл., 30 мл
Смотр. «Приготовление реагентов»

Примечание: *Дополнительный 0 стандарт для разбавления образца доступен по запросу.*

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм ±10 нм (напр. микропланшетный ридер фирмы DRG).
2. Калиброванные точные пипетки
3. Абсорбирующая бумага.
4. Дистиллированная вода

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

При хранении при 2-8°C неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микропланшет необходимо хранить при 2-8°C.

Как только фольговая упаковка была открыта, нужно следить за тем, чтобы она была тщательно закрыта после использования.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приведите все реагенты и стрипы, что будут использоваться к комнатной температуре.

Промывочный буфер

Добавьте 1170 мл деионизированной воды к промывочному буферу (30 мл), чтобы достичь окончательный объем 1200 мл. *Разбавленный промывочный буфер стабилен 2 недели при комнатной температуре.*

Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно национальным требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности.

ПОВРЕЖДЕНИЕ НАБОРА

При повреждении набора или компонентов, необходимо письменно уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

ОБРАЗЦЫ

Для анализа должна использоваться сыворотка или плазма (EDTA, гепарин или цитратная плазма).

Не используйте для анализа гемолизированные, иктерические и липемические пробы.

Внимание: не должны использоваться образцы, которые содержат азид натрия.

Сбор образцов**Сыворотка:**

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность стуситься и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать перед полным до полного оада. Пациентам, которые проходят антикоагулянтную терапию, необходимо увеличить продолжительность процесса стусения крови.

Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и ее нужно центрифугировать сразу же после забора.

(Например, для EDTA плазмы - Sarstedt Monovette - красная крышка - # 02.166.001; для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette - оранжевая крышка - # 02.165.001; для цитратной плазмы - Sarstedt Monovette - зеленая крышка - # 02.167.001)

Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 5 дней при 2-8°C.

Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить 0 стандартом и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

Например:

- Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);

- Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте)

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Общие замечания

1. Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
2. После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
3. Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
4. Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Рекомендуется, чтоб перед началом анализа все необходимые реагенты были приготовлены, крышечки сняты, все нужные лунки установлены в держателе и т.д. Это обеспечит равное время для каждого шага пипетирования без прерывания.
5. В основном энзимная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Каждый анализ должен включать стандартную кривую.

1. Поместите стрипы, которые будут использованы в анализе в специальный держатель стрипов.
2. Пипеткой внесите **25 мкл** каждого стандарта, контроля и образца, используя новые наконечники, в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **200 мкл** энзимного конъюгата в каждую лунку планшета.
4. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
5. Инкубируйте в течении **60 минут** при комнатной температуре (не накрывая).
6. Резко встряхните содержимое лунок.
Промойте разведенным промывочным раствором три раза (**400 мкл** на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.
Важное замечание:
Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!
7. Добавьте **200 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
8. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
9. Добавьте **100 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
10. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты. Другие функции обработки данных могут дать немного другой результат.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

Типичный пример стандартной кривой:

Последующие данные используются только в демонстрационных целях и **не должны** использоваться вместо обработки данных во время анализа.

Стандарт	нг/мл	Оптич. Единицы (450 нм)
Стандарт 0	0	2,1
Стандарт 1	0,2	1,71
Стандарт 2	0,5	1,44
Стандарт 3	1	1,18
Стандарт 4	2	0,89
Стандарт 5	6	0,46
Стандарт 6	16	0,24

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения. При изучении очевидных здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие данные:

Население	5% процентность	95% процентность
Мужчины	2,0 нг/мл	6,9 нг/мл
Женщины	0,26 нг/мл	1,22 нг/мл

Контроль качества

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов. Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными. В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания. Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0-16 нг/мл

Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность.

Соединение	% перекрестных реакций
Тестостерон	100
5α-Дегидротестостерон	0,8
Андростендион	0,9
11β-Гидроксиэстостерон	3,3
17β-Метилтестостерон	0,1
19-нортестостерон	3,3
Эпитестостерон	<0,1
Оэстрадиол	<0,1
Прогестерон	<0,1
Кортизол	<0,1
Оэстрон	<0,1
Даназол	<0,1

Чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена для среднего минус два стандартных отклонения 20 репликантов анализа 0 стандарта и равно 0,083 нг/мл.

Точность

Внутри тестовая

Межтестовая

сы во р.	n	среднее нг/мл	КВ %	с ы в о р	n	среднее нг/мл	КВ %
1	20	0,73	4,16	1	20	0,82	9,94
2	20	4,88	3,28	2	20	5,20	6,71
3	20	11,26	3,34	3	20	11,38	4,73

Воспроизводимость

Образцы были обогащены добавлением тестостерона раствора при известной концентрации 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены добавлением половины значения, определенных для неразбавленных образцов и половины значений для известных растворов. % восстановления был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Сыворотка	Добавленная конц. 1:1 (v/v) (нг/мл)	Измеренная конц. нг/мл	Ожидаемая конц. нг/мл	Извлечение %
1	0,0	1,10		
	16,0	9,31	8,55	109,0
	6,0	3,93	3,55	110,7
	2,0	1,67	1,55	107,9
	1,0	0,91	1,05	86,9
2	0,0	6,07		
	16,0	11,81	11,03	107,1
	6,0	6,65	6,03	110,1
	2,0	3,73	4,03	92,5
	1,0	3,26	3,53	92,2
3	0,0	11,62		
	16,0	14,76	13,63	108,3
	6,0	9,33	8,63	108,1
	2,0	7,29	6,63	110,0
	1,0	6,75	6,13	110,1

Линейность

Сыворотка	Фактор разведения	Измерянная концент., нг/мл	Ожидаемая концент., нг/мл	Извлечение
1	неразведенный	1,10	1,10	
	1:2	0,51	0,55	93,8
	1:4	0,24	0,27	86,1
	1:8	0,15	0,14	106,6
2	неразведенный	6,07	6,07	
	1:2	3,36	3,03	110,6
	1:4	1,66	1,52	109,2
	1:8	0,68	0,76	89,0
	1:16	0,37	0,38	97,0
3	неразведенный	11,26	11,26	
	1:2	5,76	5,63	102,4
	1:4	2,76	2,81	97,9
	1:8	1,55	1,41	110,0
	1:16	0,77	0,70	109,5

ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**Влияющие вещества**

Неправильное обращение с образцами или модификация теста может влиять на результаты.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,25 мг/мл) и триглицериды (до 7,5 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

Влияние большой дозы

Не было замечено такого влияния.

ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ**Достоверность результатов**

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные, только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации. При возникновении каких-либо вопросов свяжитесь с компанией DRG.

Терапевтическое заключение

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться только на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Только когда лабораторные результаты полностью соответствуют клинической картине пациента можно разрабатывать терапевтическое заключение.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

Надежность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора как и замена поврежденного набора в результате неправильного его использования работниками лаборатории.

Любые повреждения при транспортировке набора не является под ответственностью производителя.

Информация для заказа:

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

