

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТЕСТОСТЕРОНУ МЕТОДОМ ІФА

Testosterone Test System

Кат. №: 3725-300А

Дата випуску інструкції: 24-05-2019

Версія: 5



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

1.0 ВСТУП

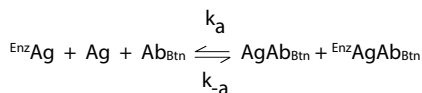
Призначення: Кількісне визначення концентрації загального Тестостерону в людській сироватці або плазмі за допомогою мікропланшетного імуоферментного аналізу, колориметричного.

2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуоаналіз (тип 7):

Реагенти, що вимагаються для твердофазового імуоферментного 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.

$\text{AgAb}_{\text{BtN}} + \text{EnzAgAb}_{\text{BtN}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}} \Rightarrow$ Іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ = 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:

А. Калібратори Тестостерону - 1 мл (мл)/флакон

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

Наприклад: 1 нг/мл (ng/ml) x 3.47 = 3.47 нмоль/л (nmol/l)

В. Ферментний реагент Тестостерону - 6.0 мл (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).

С. Біотиновий реагент Тестостерону - 6.0 мл (мл)

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

D. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

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

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

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

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

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

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°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 (°C). Стабільність набору і компонентів визначені на етикетці.

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

4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 10, 50 та 100 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm)
5. Фільтрувальний папір для просушування планшета
6. Поліетиленова 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, ВГС 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, NHS 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 порівняності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натщесерце. Зберіть кров в пробірці для венепункції з червоною кришкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірці з ЕДТА 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 (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, бажано протягом ночі, щоб забезпечити пробу натщесерце.

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

1. Промивний буфер

Розведіть концентрат промивного буфера у відповідному посуді, до 1000 мл (ml) 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 (°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 (°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 (°C).
- Додайте по 0.010 мл (ml) (10 мкл (µl)) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) Ферментного кон'югату Тестостерону в кожну лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) 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 декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл (µl) буфера для промивок (див. розділ «Підготовка 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 утворення повітряних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Підготовка 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 кожну лунку 50 мкл (µl) 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 (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 12 нг/мл (ng/ml) 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.

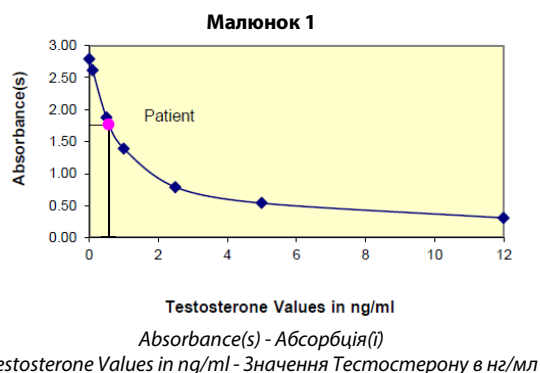
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації Тестостерону в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення 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 (ng/ml) (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 (ng/ml))
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 (ng/ml) 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
 - Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворених і недостовірних результатів.
 - Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
 - 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.
 - Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
 - 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.
 - Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- 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.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- 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.
- 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 (ng/ml))

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 визначення 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 (ng/ml))

Зразок	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 (ng/ml))

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 дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.576 пг (pg) для даного набору. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.0576 нг/мл (ng/ml) для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл (ng/ml)) 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 (ng/ml)). 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	$y = -0.265 + 0.944x$	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. Перехресна 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
ДГЕА-С	< 0.0001
Естрадіол	< 0.0001
Естрон	< 0.0001
Естріол	< 0.0001
Гемоліз	< 0.0001
Краснуха	< 0.0001
Ліпемія	< 0.0001

