



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

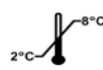
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Інструкція з використання Вільний тестостерон ELISA 2-го покоління

REF

AA E-1800



IVD

CE

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Для прямого кількісного визначення вільного тестостерону методом імуноферментного аналізу в сироватці крові людини. Тільки для діагностики *in vitro*.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Принцип імуноферментного аналізу впливає з типового конкурентного зв'язування. Конкуренція відбувається між неміченим антигеном (присутній в стандартах, контролях і зразках пацієнта) і фермент-міченим антигеном (кон'югатом) для обмеженого числа антитіл зв'язування на планшеті. Промивання і фільтрація видаляють незв'язані матеріали. Після промивання субстрат ферменту додається. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину. Оптичну густину вимірюють на ІФА - рідері. Інтенсивність утвореного кольору обернено пропорційна концентрації вільного тестостерону в зразку. Набір стандартів використовується для побудови стандартної кривої, з якої кількість вільного тестостерону в зразках пацієнта і контролю можуть бути безпосередньо зчитані. У наборі вільного тестостерону використовуються високоспецифічні кролячі анти-тестостерону поліклональні антитіла при низькій здатності зв'язування ($K_{eq} \times \text{концентрація}$) для збереження мінімальних порушень тестостерон-білкової рівноваги. Інші компоненти, в тестовій системі, також оптимізовані для того, щоб не призвести до зміни концентрації оригінального вільного тестостерону.

КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Тестостерон є С-19 стероїдом, який виділяється з сім'яників і кори надниркових залоз у чоловіків і з кори надниркових залоз і яєчників у жінок. Тестостерон також продукується з периферичних тканин андростендіону, який має мало фізіологічного значення у чоловіків, однак у жінок близько половини циркулюючого тестостерону отримані з цієї тканини. Вимірювання рівня тестостерону використовуються в основному для клінічної оцінки гіпогонадізму чоловіків і гіперандрогенних станів у жінок. Тестостерон, що циркулює в крові, зв'язується з трьома білками: зв'язує статеві гормони глобуліну (60-80%), альбумін і кортизол пов'язаний глобулін. Лише близько 1-2% від загального циркулюючого тестостерону залишається непов'язаним або вільним. Незважаючи на те, що дослідження тривають, більшість дослідників приймають вільне визначення тестостерону мірою біологічно активної фракції. Вільні визначення тестостерону рекомендовані для подолання впливу, викликаного змінами в транспорті білків в загальній концентрації тестостерону.

ПРОЦЕДУРНІ ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Користувачі повинні мати повне розуміння цього протоколу для успішного використання набору. Надійне виконання буде досягнуто тільки шляхом суворого і ретельного дотримання інструкції.
2. Матеріали контролю або сироватка повинні бути включені в кожному прогоні на високому і низькому рівні для оцінки достовірності результатів.
3. Коли використання води визначається для розведення або відновлення, використовують деіонізовану або дистильовану воду.
4. Для зменшення впливу потенційно шкідливих речовин, слід надягати рукавички при поводженні з набором реагентів і зразками пацієнтів.
5. Всі реагенти набору і зразки повинні бути доведені до кімнатної температури і обережно, але ретельно перемішані перед використанням. Уникайте повторного заморожування і розморожування реагентів і зразків.
6. Калібрувальна крива повинна бути встановлена для кожного прогону.
7. Контролі повинні бути включені в кожному прогоні і відповідати межах встановлених лімітів довіри.

8. Неправомірні процедурні методи, неточне піпетування, неповна промивка, а також неправильне зберігання реагентів може бути зазначено, коли значення аналізу для контролю не відображають встановлений діапазон.

9. При читанні мікропланшету, наявність бульбашок в лунках впливатиме на оптичну густину (ОГ). Обережно видаліть бульбашки перед виконанням читання.

10. Розчин субстрату (ТМБ) чутливий до світла і повинен залишатися безбарвним при зберіганні належним чином. Нестабільність або забруднення може бути позначено розвитком блакитного кольору, і в цьому випадку розчин не може бути використаний.

11. При дозуванні субстрату і стоп розчину, не використовуйте піпеток, в яких ці рідини придуть в контакт з будь-якими металевими частинами.

12. Для запобігання забруднення реагентів, використовуйте новий одноразовий наконечник піпетки для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту і контролю.

13. Не слід змішувати компоненти набору різних номерів лотів в тесті і не використовуйте будь-який компонент за межами терміну придатності, зазначеного на етикетці.

14. Набір реагентів слід розглядати як небезпечні відходи і утилізувати відповідно до національних правил.

ОБМЕЖЕННЯ

1. Всі реагенти в наборі калібровані для прямого визначення вільного тестостерону людини в сироватці крові. Набір не відкалібрований для визначення вільного тестостерону в інших зразках людського або тваринного походження.

2. Не використовувати сильно гемолізовані, ліпемічні, жовтяничні сироватки або сироватки, що неправильно зберігалися.

3. Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тімеросал, не сумісні з цим набором, так як вони можуть призвести до помилкових результатів.

4. Зразки, які читаються вище, ніж 60 пг / мл не слід розбавляти. Розведення змінить рівновагу між вільним тестостероном і білками сироватки.

5. Результати, отримані за допомогою цього набору ніколи не повинні використовуватися в якості єдиної основи для клінічного діагнозу. Наприклад, поява гетерофільних антитіл у пацієнтів, які регулярно вживають продукцію тваринного походження має потенціал заподіяння перешкоди в імунологічних тестах. Отже, клінічний діагноз повинен включати в себе всі аспекти фону пацієнта, включаючи частоту споживання продуктів тваринного походження, якщо підозрюються помилкові результати.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ БЕЗПЕКИ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНО БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНОЇ МАТЕРІАЛ

Сироватка людини, яка була використана при приготуванні стандартів і контролів була перевірена і встановлено, що не є реактивною для поверхневого антигену вірусу гепатиту В, а також була протестована на наявність антитіл до HCV і Вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) і результати виявилися негативними. Однак жоден метод тестування не може запропонувати повної впевненості в тому, що ВІЛ, вірус гепатиту С і вірус гепатиту В або будь-які інфекційні агенти відсутні. Реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку і звертатися з тими ж заходами щодо будь – якого зразку крові.

ХІМІЧНІ НЕБЕЗПЕКИ

Уникати контакту з реагентами, що містять ТМБ, перекис водню і сірчану кислоту. У разі контакту з будь-яким з цих реагентів промийте великою кількістю води. ТМБ є підозрюваним канцерогеном.

ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ

Приблизно 0,1 мл сироватки потрібно для подвійного визначення. Відберіть 4-5 мл крові в позначену призначену пробірку і дайте згорнутися. Центрифугуйте і ретельно видаліть шар сироватки. Зберігати при температурі 4 ° С до 24 годин або при температурі -10 ° С або нижче, якщо аналізи повинні бути зроблені більш пізньою датою. Розглядайте всі людські зразки, як потенційно небезпечні і приймайте відповідні запобіжні заходи при поводженні.

ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА ЗРАЗКА

Цей аналіз являє собою пряму систему; попередньої обробки зразка не потрібно.

РЕАГЕНТИ І ОБЛАДНАННЯ, НЕОБХІДНІ, але не надані

- точні піпетки для видачі 25, 50, 100, 150 і 350 мкл
- Одноразові наконечники для піпеток
- Дистильована або дейонізована вода
- 37 ° С інкубатор
- ІФА-рідер мікропланшетів з фільтром на 450Нм і верхньою межею ОГ 3.0 або більше *
(Див процедура аналізу крок 11).

РЕАГЕНТИ НАДАНІ

AA E-0030 WASH CONC 10 x

Концентрат промивного буфера потребує підготовки - X10

Зміст: Один флакон, що містить буфер з неіоногенним детергентом і нертутним консервантом.

Обсяг: 50 мл / пляшка

Зберігання: при 2-8 ° С

Стабільність: 12 місяців або, як зазначено на етикетці.

Приготування: розвести в співвідношенні 1:10 з дистильованою або дейонізованою водою перед використанням. Якщо весь мікропланшет повинен використовуватися, розбавте 50 мл промивного буфера концентрату в 450 мл води.

AA E-0055 SUBSTRATE TMB субстрат - готовий до використання.

Склад: Один флакон, що містить тетраметилбензидин і перекис водню в не-ДМФ або буфері, що містить ДМСО.

Обсяг: 16 мл / пляшка.

Зберігання: охолодженим при 2-8 ° С

Стабільність: 12 місяців або, як зазначено на етикетці.

AA E-0080 STOP SOLN Стоп розчин готовий до використання.

Склад: Один флакон, що містить 1 М сірчаної кислоти.

Обсяг: 6 мл / флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8 ° С

Стабільність: 12 місяців або, як зазначено на етикетці.



Ідентифікація біологічної небезпеки :

H290 може бути корозійним до металів

H314 може спричиняти опіки шкіри та пошкодження очей.

Стандарти та контролі - готові до використання.

Нижче наведені приблизні концентрації, будь ласка, зверніться до етикеток флаконів для точних концентрацій:

Кат. номер.	Символ	Стандарт	Концентрація	Об'єм / флакон
AA E-1801	STANDART A	Стандарт А	0 пг / мл	0,5 мл
AA E-1802	STANDART B	Стандарт В	0,1 пг / мл	0,5 мл
AA E-1803	STANDART C	Стандарт С	1 пг / мл	0,5 мл
AA E-1804	STANDART D	Стандарт D	5 пг / мл	0,5 мл
AA E-1805	STANDART E	Стандарт E	20 пг / мл	0,5 мл
AA E-1806	STANDART F	Стандарт F	60 пг / мл	0,5 мл
AA E-1851	Control 1	Контроль 1		0,5 мл
AA E-1852	Control 2	контроль 2		0,5 мл

Див етикетки флаконів для очікуваного значення і допустимого діапазону!

Вміст: Приготований за допомогою збільшення сироватки з точною кількістю тестостерону, еквівалентного приблизно 0, 0,1, 1, 5, 20 і 60 пг / мл вільного тестостерону.

Зберігання: охолодженим при 2-8°C

Стабільність: 12 місяців у невідкритих флаконах або як зазначено на етикетці. Після відкриття стандарти повинні бути використані протягом 14 днів або аліквотовані і зберігатися замороженими. Уникайте циклів багаторазового заморожування та відтавання.

AA E-1413 ASSAY BUFF буфер аналізу - готовий до використання.

Містить: Один флакон, що містить буфер на основі білка з нертутним консервантом.

Обсяг: 15 мл / пляшка.

Зберігання: охолодженим при 2-8 ° C

Стабільність: 12 місяців або, як зазначено на етикетці.

AA E-1431 96 Кролячим анти-вільним Тестостерон Антитілом покритий розбірний Мікропланшет - готовий до використання.

Містить: Один 96 луночний (12x8) поліклональними антитілами покритий мікропланшет в багаторазовому пакеті з осушувачем.

Зберігання: охолодженим при 2-8 ° C

Стабільність: 12 місяців або, як зазначено на етикетці.

AA E-1840 CONJUGATE-CONCENTRATE Вільний Тестостерон - пероксидаза хрому (HRP) кон'югату концентрат - X50 потребує приготування

Містить: Вільний Тестостерон-HRP кон'югату в буфері на білковій основі з нертутним консервантом.

Обсяг: 300 мкл / флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8 ° C

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Приготування: розвести в співвідношенні 1:50 в буфері для аналізу перед використанням (наприклад, 40 мкл HRP в 2 мл буфера для аналізу). Якщо весь мікропланшет повинен використовуватися розвести 240 мкл HRP в 12 мл буфера для аналізу. Видалити будь-які залишки розчину.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Попередня обробка зразків: **не потрібна**.

Всі реагенти необхідно довести до кімнатної температури перед використанням. Стандарти, контролю і зразки повинні аналізуватися в дублікатах. Після початку процедури, всі кроки повинні бути завершені без перерви.

1. Підготуйте робочі розчини вільного тестостерону-HRP кон'югату і промивного буфера.
2. Відокремте необхідну кількість стріпів мікропланшетів. Закрити пакет і повернути невикористані стріпи в холодильник.
3. Прокапати 25 мкл кожного стандарту, контролю і зразка в відповідним чином помічені лунки в дублікатах.
4. Прокапати 100 мкл кон'югату робочого розчину в кожен лунку. (Ми рекомендуємо використовувати багатоканальну піпетку).
5. Обережно струсіть пластину протягом 10 секунд.
6. Інкубуйте планшет при 37 ° С протягом 1 години
7. Промийте кожен лунку по 3 рази з 350 мкл розведеного промивного буфера, постукайте планшетом міцно об абсорбуючий папір для забезпечення його сухості (рекомендується використовувати вошер.)
8. Прокапайте 150 мкл ТМБ - субстрату в кожен лунку через задані інтервали часу.
9. Інкубуйте при 37 ° 10-15 хвилин (або до того моменту, коли Стандарт А придбає темно-синій колір, досягнувши бажаної оптичної густини (ОГ) .
10. Додайте 50 мкл Стоп-розчину в кожен лунку через ті ж інтервали, що і в етапі 8.
11. Зчитати результат на рідері мікропланшетів при довжині хвилі 450 нм протягом 20 хвилин після додавання Стоп-розчину.

Якщо ОГ перевищує верхню межу виявлення або фільтр 450 нм недоступний, то можна замінити на фільтр 405 або 415 нм . Оптичні густини будуть нижче, однак, це не вплине на результати пацієнтів / контрольні зразки.)

РОЗРАХУНКИ

1. Розрахувати середню оптичну густину кожного калібратора в дублях.
2. Намалюйте стандартну криву на навіл-логарифмічному папері зі значеннями оптичної густини на осі ординат, і стандартом концентрації на осі абсцис. Якщо програмне забезпечення імуноферментного аналізу використовується, 4-х параметрова або 5-параметрова крива рекомендується.
3. Обчислити середню оптичну густину кожного невідомого в дублях.
4. Зчитати значення невідомих безпосередньо від стандартної кривої.

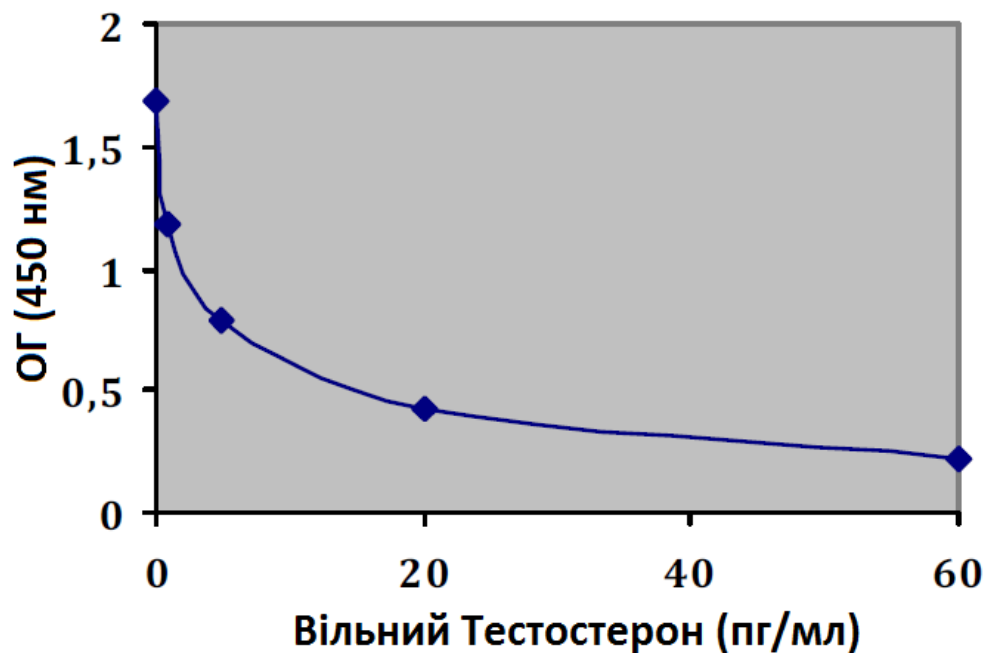
Типова таблиця даних:

Дані приведені тільки для приклада.

Не використовувати для обчислення результатів.

Стандарт	Середня ОГ	Значення (пг/мл)
A	2,292	0
B	1,680	0,1
C	1,181	1
D	0,780	5
E	0,426	20
F	0,214	60
невідомий	1,066	1,59
невідомий	0,441	19,6

Типова калібрувальна крива (не використовуйте для розрахунку)



ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

ЧУТЛИВІСТЬ

Межа виявлення (МВ) визначалася з аналізу 64 повторів зразків з низькими значеннями та з МП (межа порожньої, бланк)

$$МВ = МП + 1,645\sigma_S,$$

де σ_S - стандартне відхилення зразка низького значення. σ_S було визначено як 0,0093 на основі 64 вимірювань зразка низького значення.

$$МВ = 0,0025 + (1,645 * 0,0093) = 0,018 \text{ пг / мл.}$$

СПЕЦИФІЧНОСТЬ (перехресна РЕАКТИВНІСТЬ)

Наступні сполуки були протестовані на перехресну реактивність з набором вільний Тестостерон ІФА 2 –го покоління з тестостероном перехресно реагують на всі 100%.

Стероїд	% перехресної реактивності
Тестостерон	100
5 α -дигідротестостерон	3,5
Андростендіон	0,17
прогестерон	0,007
андростерон	0,075
альдостерон	<0.008
холестерол	<0.0001
кортизон	0,0025
ДГЕА	0,071
ДГЕА-С	0,0014
17 β -естрадиол 0.15	0,15
естріол	<0.008
прегненолон	0,028

ТОЧНІСТЬ В АНАЛІЗІ

П'ять зразків аналізували 24 рази кожен з тієї ж стандартної кривої. Результати (в пг / мл) наведені нижче:

Зразок	середнє	CV %
1	2,24	6,7
2	3,81	6,4
3	13,6	6,0
4	13,7	5,9
5	23,7	4,8

ТОЧНІСТЬ МІЖ АНАЛІЗАМИ

Три зразка аналізували 20 разів в дублікатах в протягом періоду , що перебільшує 10 днів. Результати (в пг / мл) наведені нижче:

зразок	середнє	CV(%)
1	3,53	8,1
2	13,8	11,5
3	23,3	6,9

8. ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Прямий Вільний Тестостерон ІФА набір (y) другого покоління був порівняний з набором конкурентом вільного тестостерону Пробірка з покриттям з RIA набір (x). Порівняння 60 зразків сироватки принесло такі лінійні результати регресії:

$$y = 0,9362x \text{ (конкурент)} + 3,8794$$

$$r = 0,97$$

ВПЛИВ ГЛОБУЛІНА, ЩО ЗВ'ЯЗУЄ СТАТЕВІ ГОРМОНИ (SHBG)

Метою даного дослідження було вивчення можливого впливу, викликаного зв'язуванням SHBG до вільного тестостерону кон'югат-HRP. Сироватковий басейн , очищений деревним вугіллям, був збагачений точно з SHBG концентрації в діапазоні від 6,25 до 200 мкг / мл і оцінений з вільний тестостерон ІФА набором.

Результати, наведені нижче (y пг / мл):

SHBG доданий	ОГ 450 нм	Процент В/Во (%)
0	2,37	100,0
6,25	2,37	99,9
12,5	2,34	98,7
50	2,36	99,5
200	2,27	95,6

Результати показали, що % зв'язуючих значень між 95 - 100% (Во = незбагачена сироватки) навіть вищий, ніж нормальний рівень SHBG. На закінчення, результати показали, що не було значного SHBG з вільним тестостероном-HRP кон'югатом.

Очікувані ЗНАЧЕННЯ НОРМАЛЬНІ

Що стосується всіх клінічних аналізів, кожна лабораторія повинна зібрати дані і створити свій власний діапазон нормальних значень. В результаті дослідження очікуваного діапазону з очевидно нормальними здоровими випробовуваними були отримані наступні результати (всі значення представлені в пг / мл):

Когортна група; стать/вік	кількість	95% довірчий інтервал	Абсолютний діапазон
Чоловіки /<13	44	-	ND - 1.6
Чоловіки / 13-19	37	-	ND - 22.3
Чоловіки /20-39	120	9,1-32,2	-
Чоловіки /40-59	120	5,7-30,7	-
Чоловіки / ≥ 60	120	5,9-27,0	-
Жінки /<13	63	-	ND – 1,3
Жінки / 13-19	17	-	0,2-2,0
Жінки /20-39	120	0,1-6,3	-
Жінки /40-59	120	0,2-4,1	-
Жінки / ≥ 60	60	0,5-3,9	-

ЛІТЕРАТУРА

1. Winter SJ, et al. The Analog Free Testosterone Assay: Are the Results in Men Clinically Useful. *Clin Chem.* 1998; 44(10):2178–82.
2. Ooi DS, et al. Establishing Reference Interval for DPC's Free Testosterone Radioimmunoassay. *Clin Biochem.* 1998; 31(1):15–21.
3. Marcus GJ, Dumford R. A Simple Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Testosterone. *Steroids.* 1985; 46:975–86.
4. Joshi UM, et al. A Sensitive Specific Enzyme Immunoassay for Serum Testosterone. *Steroids.* 1979; 34(1):35–46.
5. Swinkels LM, et al. Salivary and Plasma Free Testosterone and Androstenedione Levels in Women. *Am Clin Biochem.* 1988; 25(Pt 4):354–9.
6. Swinkels LM, et al. A Symetric Dialysis Method for the Determination of Free Testosterone in Human Plasma. *Clin Chem Acta.* 1987; 165(2–3):341–9.
7. Ekins R. Hirsutism: Free and Bound Testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1990; 27(Pt 1):91–4.
8. Manni A, et al. Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. *J Clin Endo Metab.* 1985; 61(4):705–10.
9. Ekins R. The Science of Free Testosterone Measurement. *Proc UK NEQAS Meeting.* 1998; 3:35–9.
10. Longcope C, et al. Free Estradiol, Free Testosterone, and Sex Hormone-Binding Globulin in Perimenopausal Women. *J Clin Endo Metab.* 1987; 64(3):513–8.
11. Vermeulen A, et al. The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. *J Clin Endo Metab.* 1971; 33(5):759–67.
12. Paulson JD, et al. Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. *Am J Obs Gyneco.* 1977; 128(8):851–7.
13. Cumming DC, Wall SR. Non-Sex Hormone-Binding Globulin-Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J Clin Endo Metab.* 1985; 61(5):873–6.
14. Baxendale PM, et al. Salivary Testosterone: Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hyperandrogenic Women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1982; 16(6):595–603.
15. Biffignandi P, et al. Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. *Endocrinol Rev.* 1984; 5(4):498–513.
16. Wu CH. Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. *Obstet Gynecol.* 1982; 60(2):188–94.
17. Bamman BL, et al. Total and Free Testosterone During Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 137(3):293–8.
18. Halpern EP, et al. Production of Anti-Testosterone Antisera in Rabbits. *Clin Chem.* 1980; 26:68.
19. Wheeler MJ. The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1995; 32(Pt 4):345–57.
20. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139–40.

Умовні позначення:

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо для <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	LOT Код партії	IVD Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
 Звертайтеся до інструкції по експлуатації	CONT зміст	CE CE Маркування
 УВАГА ! ОБЕРЕЖНО !	REF каталожний номер	RUO тільки для дослідницького використання !