

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11. ЛІТЕРАТУРА	8

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТЕСТОСТЕРОНУ В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «Тестостерон-ІФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набір реагентів «Тестостерон-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації тестостерону у сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Тестостерон – стероїд з молекулярною масою 288.4 Да. Основним місцем утворення тестостерону в сім'яниках є клітини Лейдига (інтерстиціальна тканина). У жінок тестостерон синтезується в наднирниках, а контроль за його продукуванням здійснює лютеїнізуючий гормон. Тестостерон стимулює розвиток чоловічих статевих органів і вторинні статеві ознаки. Секреція тестостерону має визначений циркадний ритм. Найвищий рівень гормону спостерігається в 6 годин ранку, найнижчий – в 20 годин. У жінок продукція тестостерону залежить від фази менструального циклу: максимальне утворення гормону відбувається в лютеїновій фазі та в період овуляції. При пухлинах із клітин Лейдига надлишок тестостерону викликає у хлопчиків симптом «немовляти Геракла». Підвищена концентрація тестостерону в плазмі є визначальним фактором маскулінізації у жінок. У дівчаток надлишок тестостерону в організмі завжди є наслідком порушення функції наднирників, а у жінок може бути пов'язаний також із захворюваннями яєчників. При цьому може припинитися овуляція і проявитися типова для чоловіків будова тіла. Недостатність тестостерону у чоловіків веде до розвитку жіночого типу статури. При цьому, у хлопчиків спостерігається недорозвинення статевих органів. З метою диференціальної діагностики первинного і вторинного гіпогонадізму, концентрацію тестостерону необхідно визначати в комплексі із дослідженнями ЛГ і ФСГ. Підвищений рівень тестостерону спостерігається при: синдромі Штейна-Левентала; у чоловіків з каріотипом ХУУ; передчасному дозріванні у хлопчиків; пухлинах кори наднирників; прийомі лікарських препаратів (барбітуратів, кломіфена, естрогенів, гонадотропіну, пероральних контрацептивів); ідіопатичному гірсутизмі. Зниження рівня тестостерону спостерігається при уремії; міотонічній дистрофії; печінковій недостатності; синдромі Клайнфелтера; крипторхізмі; первинному та вторинному гіпогонадізмі; синдромі Каллмана; прийомі андрогенів, дексаметазону, дигоксину, етанолу, галотану.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення тестостерону ґрунтується на використанні конкурентного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі поліклональні антитіла проти тестостерону. Тестостерон зі зразка конкурує з кон'югованим тестостероном за зв'язування з антитілами на поверхні лунки. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина у лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації тестостерону в досліджуваному зразку. Концентрацію тестостерону в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту тестостерону в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність.

Перехресна реакція мишачих поліклональних антитіл проти тестостерону з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
Тестостерон	100
5-альфа-дегідротестостерон	16
Андростендіол	1.0
Андростендіон	0.4
Андростерон	<0.1
Дегідроепіандростерон	<0.1
Прогестерон	<0.1
Естрадіол, естріол	<0.01
Кортизол, прегненолон	<0.01

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту тестостерону у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «Тестостерон-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації тестостерону у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить тестостерон, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 1.0–40 нмоль/л і складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації тестостерону підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 5 нмоль/л. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «Тестостерон-ІФА» концентрація тестостерону у сироватці (плазмі) крові не перевищує 0.15 нмоль/л

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Найменування	Кількість	Од.	Опис
1	P209Z	SORB MTP Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт.	
2	C209Z	CAL 1-6 Калібрувальні проби на основі сироватки крові людини, що містять відомі кількості тестостерону – 0; 1; 3; 10; 30; 100 нмоль/л, готові до використання (по 0.8 мл кожна)	6	шт	прозора рідина синього кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q209Z	CONTROL CONTROL 2 Контрольні сироватки на основі сироватки крові людини з відомим вмістом тестостерону, готові до використання (0.8 мл)	2	шт	прозорі рідини пурпурового кольору
4	T209Z	CONJ HRP Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора рідина зеленого кольору
5	R055Z	SUBS TMB Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
6	S008Z	BUF WASH 26X Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	R050Z	STOP Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	N003	- Плівка для заклеювання планшета	2	шт	-
9	K209I	- Інструкція з використання Набору реагентів «Тестостерон-ІФА»	1	шт	-
10	K209Q	- Паспорт контролю якості Набору реагентів «Тестостерон-ІФА»	1	шт	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Потенційний ризик застосування Набору – клас 26 (ДСТУ 4888:2005).

5.2. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5.0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.3. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила обладнання, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.4. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, який може тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.5. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, який дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, який підтримує температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, які дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору та досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. У разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «Тестостерон-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

Допускається одноразове заморожування (-20°C) калібрувальних проб та контрольних сироваток в аліквотах.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 40 досліджуваних зразків, 6 калібрувальних проб і 2 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися еквикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C;
- кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;
- калібрувальні проби та контрольні сироватки, після відкриття флаконів, слід зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;
- концентрат розчину для відмивання, який залишився невикористаним, слід зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності;
- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб;

Важливе зауваження. Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) крові необхідно зберігати при -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищенні) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків у двох портах і 16 лунок для калібрувальних проб та контрольних сироваток.
2	Внесіть у відповідні лунки у двох повторях по 25 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторях по 25 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольних сироваток та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
3	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
4	Обережно перемишіть вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 120 хвилин при температурі +37°C. Допускається інкубація протягом 60 хвилин при +37°C та постійному струшуванні 600 об/хв.
5	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшіть планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаліть рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
6	Внесіть в усі лунки по 100 мкл розчину тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2–3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин, в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
7	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту ; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
8	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за повітрям.
9	Побудуйте у напівлогарифмічних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – десятиковий логарифм концентрації тестостерону в калібрувальних пробах (нмоль/л), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод. Прирівняйте концентрацію калібрувальної проби С1 до несуттєво малої величини, наприклад 0.001 нмоль/л.
10	Визначте за калібрувальним графіком вміст тестостерону у досліджуваних зразках.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка. значення концентрацій тестостерону у досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.15 нмоль/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (100 нмоль/л), належить проводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація тестостерону нижча за 0.15 нмоль/л» або «вища за 100 нмоль/л».

В Наборі «Тестостерон-ІФА» значення концентрацій калібрувальних проб наведені в нмоль/л. Для перерахунку концентрацій в нг/мл, отримане значення концентрації в нмоль/л слід домножити на 0.29.

$$1 \text{ нмоль/л} = 0.29 \text{ нг/мл}$$

Досліджувана група	Одиниці, нмоль/л		Одиниці дод., нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
Чоловіки				
20-39 років	9.0	38	2.6	11
40-55 років	6.9	21	2.0	6.1
після 55 років	5.9	18.1	1.7	5.2
Жінки	-	4.6	-	1.3

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Tietz, N.W. Textbook of Clinical Chemistry. Saunders, 1986.
2. Joshi, U. M., et al. Steroids 34 (1) 35 (1979).
3. Turkes, A., et al. J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979).
4. Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R. J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 – 184 (1972).
5. Rajkowski, K. M., Cittanova N., Desfosses, B. and Jayle, M.F. Steroids 29 no 5 1977 6. Widsdom G. B. Clin. Chem. 22/8, 1243 – 1255 (1976).

З питань якості Набору «Тестостерон-ІФА»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23;

тел./факс: + 38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua;

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Еліна Володимирівна