

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТЕСТОСТЕРОНУ В СЛИНІ «Тестостерон плюс-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «Тестостерон плюс-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації вільного тестостерону в слині методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Тестостерон – стероїд з молекулярною масою 288.4 Да. Основним місцем утворення тестостерону в сім'яниках є клітини Лейдіга (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 і в період овуляції. У складі сироватки крові тестостерон знаходиться у вільному і зв'язаному з транспортними білками (ССГ, альбумін) стані. Біологічну активність має тільки вільна форма гормону, яка становить менше 1% від його загальної кількості. В даний час не існує надійних імунохімічних методів визначення вільного тестостерону в сироватці крові, а складні референсні лабораторні методики (рівноважний діаліз) не призначені для повсякденного використання. Тому єдиним методом прямого аналізу вільного тестостерону є його визначення в слині. Динамічне дослідження рівня тестостерону в слині є надзвичайно інформативним і нетравматичним методом, який використовується в ендокринології, а також в фізіології, спортивній медицині, ветеринарії та ін. для оцінки андрогенного статусу організму. Підвищення концентрації тестостерону в слині у жінок супроводжує гірсутизм, полікістоз яєчників і є лабораторним маркером маскулінізації. Стійкі низькі концентрації тестостерону в слині чоловіків є ознакою первинного або вторинного гіпогонадізму. Підвищення рівня тестостерону відзначаються при: синдромі Штейна-Левенталя; у чоловіків з каріотипом ХУУ; передчасному дозріванні у хлопчиків; пухлинах кори надниркових залоз; прийомі лікарських препаратів (барбітуратів, кломіфену, естрогенів, гонадотропіну, пероральних контрацептивів); ідіопатичному гірсутизмі. Зниження рівня тестостерону відзначається при уремії; міотонічній дистрофії; печінкової недостатності; синдромі Клайнфелтера; крипторхізмі; первинному і вторинному гіпогонадізмі; синдромі Каллмана; прийомі андрогенів, дексаметазону, дигоксину, етанолу, галотана.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення тестостерону ґрунтується на використанні конкурентного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні 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 моноклональних 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 слини з використанням Набору «Тестостерон плюс-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації вільного тестостерону в зразках слини при розведенні їх слиною, що не містить вільний тестостерон, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 0.03-3.0 нмоль/л і становить $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» - відповідність виміряної концентрації вільного тестостерону підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки і калібрувальної проби 0.1 нмоль/л. Відсоток «відкриття» становить 90-110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «Тестостерон плюс-ІФА» концентрація вільного тестостерону в слині не перевищує 0.015 нмоль/л.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-ть	Од.	Опис
1	P209SZ	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт	-
2	C209SZ	CAL 1 - 6	Калібрувальні проби на основі трис-буфера (рН 7.2-7.4), що містять відомі кількості вільного тестостерону - 0; 0.03; 0.1; 0.3; 1; 3 нмоль/л, готові до використання (по 1 мл кожна)	6	шт	прозорі безбарвні рідини
3	Q209SZ	CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом вільного тестостерону, готові до використання (1 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T209SZ	CONJ HRP	Кон'югат, готовий до використання (6 мл)	1	шт	прозора рідина яскраво-червоного кольору
5	R055Z2	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ), готовий до використання (16 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
6	S008Z	BUF WASH 26X	Розчин 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	K209SI	-	Інструкція з використання Набору реагентів «Тестостерон плюс-ІФА»	1	шт	-
10	K209SQ	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «Тестостерон плюс-ІФА»	1	шт	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. 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 потрапленні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, 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).

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

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

5.5. Усі використані одноразові матеріали необхідно обробити дезінфікуючими засобами з подальшою утилізацією (див. ДСанПіН «Державні санітарно-протиепідемічні правила і норми щодо поводження з медичними відходами»).

5.6. Медичні відходи класу Б. Утилізацію чи знищення, дезінфекцію Наборів реагентів слід проводити у відповідності з ДСанПіН «Державні санітарно-протиепідемічні правила і норми щодо поводження з медичними відходами» та ДСанПіН «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я»

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

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густина вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 10–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

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

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ 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. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «Тестостерон плюс-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до $+25^{\circ}\text{C}$ не довше 5 діб. Не допускається заморожування цілого Набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 41 досліджуваних зразків, 6 калібрувальних проб і 1 проби контрольної сироватки (всього 96 визначень).

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

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору;
- кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом усього терміну придатності Набору;

- концентрат розчину для відмивання, який залишився невикористаним, необхідно 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.

8.6. 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 - досліджувані зразки в 2 повторах та 14 лунок для калібрувальних проб і контрольної сироватки.
2	Внесіть у відповідні лунки в двох повторах по 100 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторах по 100 мкл досліджуваних зразків слини. Внесення калібрувальних проб та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 5-10 хв.
3	Внесіть у всі лунки по 50 мкл кон'югату.
4	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 120 хвилин при температурі +37°C.
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), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видаляти залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
6	Внесіть в усі лунки по 150 мкл розчину субстрату 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 здійснити протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за повітрям.
9	Побудуйте у напівлогарифмічних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – десятковий 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 нескінченно малої величини, наприклад 0.001 нмоль/л.
10	Визначте за калібрувальним графіком вміст вільного тестостерону досліджуваних зразках.

Таблиця М

Підготовка зразків

Вид матеріалу	Збір, зберігання та обробка матеріалу	Зразок в лунку, мкл	Фактор перерахунку
слина	<p>Відбір проб</p> <ul style="list-style-type: none"> - зразки слини можна збирати не раніше ніж через 30 хвилин після чищення зубів, прийому їжі або використання жувальної гумки. - для збору проб слини рекомендується використовувати пробірки з полістиролу. - проби слини, що містять сліди крові - пофарбовані в рожевий або жовтий колір, використовувати для аналізу не можна. <p>Зберігання проб</p> <p>Зразки слини можна зберігати протягом 2 тижнів при 2-8°C або протягом 6 місяців при - 20°C.</p> <p>Підготовка проб до аналізу</p> <p>Досліджувані зразки слини потрібно витримати не менше 3 годин при -20°C, потім розморозити при кімнатній температурі і ретельно відцентрифугувати при 3000 об/хв.</p> <p>Для визначення тестостерону рекомендується використовувати пробу, підготовлену змішуванням рівних об'ємів 3-5 зразків слини, взятих з інтервалом в 30 хвилин.</p>	100	1

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 вільного тестостерону в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.015 нмоль/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (3 нмоль/л) необхідно приводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація прогестерону нижча за 0.015 нмоль/л» або «вища за 3 нмоль/л».

У Наборі «Тестостерон плюс-ІФА» значення концентрацій калібрувальних проб виражені в нмоль/л. Для перерахунку концентрацій в пг/мл, отримане значення концентрації в нмоль/л слід домножити на 0.29. 1 нмоль/л = 0.29 пг/мл.

Досліджувана група	Одиниці нмоль/л		Одиниці дод. пг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
Чоловіки				
	0.2	1.16	0.0580	0.3364
Жінки				
	0.03	0.47	0.0087	0.1363

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 плюс-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

