

PATHOZYME® TESTOSTERONE Ref OD497

Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczania testosteronu w ludzkiej surowicy.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.
Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Testosteron (17β-hydroksyandro-4-ene-3-one) jest 19 węglowym steroidem z nienasyconymi wiązaniami pomiędzy węglami C-4 i C-5, grupą ketonową przy węglu C-3 i grupą hydroksylową w pozycji β przy węglu C-17. Masa cząsteczkowa tego hormonu steroidowego wynosi 288.4 daltonów.

Testosteron jest najważniejszym androgenem wydzielanym do krwi. U mężczyzn, testosteron jest głównie wydzielany przez komórki Leydiga w jądrach; u kobiet ok. 50% krążącego testosteronu pochodzi z obwodowej konwersji androstenedionu, ok. 25% z jajników, a ok. 25% z nadnerczy. Testosteron jest odpowiedzialny za rozwinięcie się drugorzędowych cech płciowych, a jego oznaczenie jest pomocne w ocenie niedoczynności gonad.

U kobiet, wysoki poziom testosteronu głównie występuje w hirsutyzmie i w wrylizacji, w zespole policystycznych jajników, nowotworach jajników, nowotworach nadnerczy i w rozroście nadnerczy.

U mężczyzn, wysoki poziom testosteronu występuje w podwzgórzowo-przysadkowych jednostkach chorobowych, nowotworach jąder, we wrodzonym rozroście nadnerczy i w nowotworach gruczołu krokowego.

Niski poziom testosteronu może wystąpić w następujących chorobach: w niedoczynności przysadki, zespole Klinefelter'a, feminizacji jąder, wycięciu jąder i we wnętrzu oraz w defektach enzymatycznych i niektórych chorobach autoimmunologicznych.

PRZEZNACZENIE

PATHOZYME TESTOSTERONE jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania całkowitego testosteronu w ludzkiej surowicy.
Do użytku w laboratorium.

ZASADA

Test PATHOZYME TESTOSTERONE oparty jest na zasadzie kompetycyjnego przyłączania pomiędzy testosteronem obecnym w badanej próbce a koniugatem zawierającym testosteron znakowany peroksydazą chrzanową (HRP), a stałą ilością króliczych przeciwciał anty-testosteronowych. Podczas procesu inkubacji, inkubowane są: kozie anty-królicze przeciwciała IgG opłaszczane na ściankach kubeczka, koniugat enzymatyczny zawierający przeciwciała znakowane HRP i odczynnik zawierający królicze przeciwciała anty-testosteronowe. Podczas tego procesu, określona ilość testosteronu znakowanego HRP współzawodniczy z endogennym testosteronem obecnym w standardach, próbce badanej lub surowicy kontrolnej, o określoną liczbę miejsc wiążących na specyficznych przeciwciałach testosteronowych. Ilość testosteronu znakowanego peroksydazą przyłączonego do ścian kubeczków w wyniku reakcji immunologicznej progresywnie spada w stosunku do wzrastającej ilości testosteronu w próbce.

Nie związany koniugat enzymatyczny zostaje odpłukany, a absorbancja jest mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Dodanie roztworu substratu inicjuje pojawienie się niebieskiej barwy. Intensywność powstałego zabarwienia jest proporcjonalna do ilości obecnego w kubeczku enzymu i odwrotnie proporcjonalna do ilości nieoznakowanego testosteronu w badanej próbce. Krzywą kalibracyjną otrzymuje się przez wykreślenie stężenia poszczególnych kalibratorów w odniesieniu do odpowiadających im absorbancji. Stężenie testosteronu w próbkach badanych i surowicach kontrolnych nastawionych równolegle ze standardami może być odczytane z wykreślonej krzywej.

Test został wykalibrowany względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU

Ref
OD497



Microtitre Plate			12 x 8 wells x 1
Cal	A	0 ng / ml	0.5 ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona testosteronu. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)			
Cal	B	0.1 ng / ml	0.5 ml
Standard referencyjny: testosteron rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)			
Cal	C	0.5 ng / ml	0.5 ml
Standard referencyjny: testosteron rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)			
Cal	D	2.0 ng / ml	0.5 ml
Standard referencyjny: testosteron rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)			
Cal	E	6.0 ng / ml	0.5 ml
Standard referencyjny: testosteron rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)			
Cal	F	18.0 ng / ml	0.5 ml
Standard referencyjny: testosteron rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)			
Control	1	Level as stated on vial	0.5 ml
Surowica zawierająca rozpuszczony testosteron o znanym mianie. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)			
Control	2	Level as stated on vial	0.5 ml
Surowica zawierająca rozpuszczony testosteron o znanym mianie. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)			

REAG	Ab	Testosterone	7 ml	
Odczynnik zawierający królicze przeciwciała anty-testosteronowe. Gotowy do użycia. (Różowy)				
Conj			11 ml	
Testosteron znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Niebieski)				
Subs	TMB		11 ml	
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Soln	Stop	HCl	1M	11 ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozpuszczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Instrukcja i druk protokołu.			1 + 1	

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.
Końcówki do pipet.
Ciepłarka: z temperaturą 37°C ± 1°C
Papier absorbacyjny.
Czytnik mikroplitek z filtrem 450 nm.
Papier milimetryowy.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME TESTOSTERONE zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME TESTOSTERONE nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME TESTOSTERONE zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu słupek obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME TESTOSTERONE zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu słupek obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielić surowicę. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydki sodowej jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnoza nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

- Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
- Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 10µl standardów i próbek badanych.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu koniugatu.
- Do każdego kubeczka dodać po 50µl odczynnika zawierającego królicze przeciwciała anty-testosteronowe. Mieszać delikatnie przez 30 sekund.
- Inkubować 90 minut w temperaturze 37°C.
- Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
- Ręczne płukanie: Napęlić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie.
- Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
- Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
- Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu. Mieszać delikatnie przez 5 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
- Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
- Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyk przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane. Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20 - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdź precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odzwierciedlenia wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{450}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości testosteronu w ng/ml dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie. Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny. Jeśli do obliczeń używany aparaty z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o równanie poligonalne z ekstrapolacją krzywej.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny odwrotnie proporcjonalny od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest większa niż 1,5 , a wartość absorbancji kalibratora F jest mniejsza niż 0,75.

Zalecane jest aby każde laboratorium ustaliło własne zakresy wartości prawidłowych w oparciu o daną populację pacjentów. Zakresy wartości prawidłowych testem **PATHOZYME TESTOSTERONE** uzyskano w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecnictwie otwartym. Uzyskane wartości przedstawiono poniżej:

Mężczyźni:	chłopcy tuż przed okresem dojrzewania	0.1-0.2ng/ml
	dorośli	3.0-10.0ng/ml
Kobiety:	dziewczynki tuż przed okresem dojrzewania	0.1-0.2ng/ml
	Faza folikularna	0.2-0.8ng/ml
	Faza lutealna	0.2-0.8ng/ml
	Po menopauzie	0.08-0.35ng/ml

CZUŁOŚĆ

Minimalny wykrywany powyższym testem poziom testosteronu wynosi 0.06ng/ml.

SPECYFICZNOŚĆ

Sprawdzono interferencję dla poniższych substancji. Wartości procentowe wskazują na interferencję w 50% przesunięcia w odniesieniu do testosteronu. Wyniki interferencji dla kilku endogennych i farmaceutycznych steroidów przedstawiono w tabeli poniżej:

Interferencja(%) = $\frac{\text{wzrost stężenia testosteronu}}{\text{stężenie steroidu}} \times 100$

Steroid	Interferencja
Testosteron	100%
Dihydrotestosteron	0.86%
Androstendion	0.89%
Androsteron	1.0%
17β Estradiol	0.05%
Progesteron	<0.05%
Epitestosteron	<0.05%
17-OH-Progesteron	<0.05%
Estriol	<0.05%
Kortyzol	<0.05%
Siarczan DHEA	<0.05%

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności **PATHOZYME TESTOSTERONE** jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega Pathozyne Testosterone kit i DRG AURICA Kit użyto próbek o wartościach testosteronu pomiędzy 0.2 ng/ml a 11.57 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	106
Współczynnik korelacji	0.9068
Wartość nachylenia krzywej	0.8397
Punkt przecięcia z osią OY	0.5732
Wartość średnia testem Omega	3.6 ng/ml
Wartość średnia testem DRG	3.6 ng/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

- Chen A., Bookstein, J.J., Meldrum, D.R.** Diagnosis of a testosterone-secreting adrenal adenoma by selective venous catheterisation. *Fertil. Steril.* 55(6): 1202-1203, 1991.
- Yen S.S.C.** Chronic anovulation caused by peripheral endocrine disorders. In, Yen S.C.C. and Jaffe R.B. (eds): *Reproductive Endocrinology* Chapter 17, W.B. Saunders, Philadelphia, 1991.
- Granoff, A.B. and Abraham, G.E.** Peripheral and adrenal venous levels of steroids in a patient with virilising adenoma. *Obstet. Gynaecol.* 53:111, 1979.
- Bricaire, C., Raynaud, A., Benotmane, A., Clair, F., Paniel, B., Mowszowicz, I., Wright, F., Moreau, J.F., Kuttan, F., Mauvais-Jarvis, P.** Selective venous catheterisation in the evaluation of hyperandrogenism. *J. Endocrinol. Invest.* 14(11): 949-956; 1991.
- Heinonen, P.K.** Androgen production by epithelial ovarian tumours in post-menopausal women. *Maturitas.* 13(2): 117-133, 1991.
- Tietz, N.W.** *Clinical Guide to Laboratory Tests*, Third Edition, p578-580. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1995.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 10µl standardów, próbek badanych i surowic kontrolnych.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu koniugatu.
- Następnie do każdego kubeczka dodać po 50µl króliczych przeciwciał anty-testosteronowych. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Inkubować 90 minut w temperaturze 37°C.
- Wylać zawartość z kubeczków i przepłukać 5-krotnie wodą destylowaną.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8099 ISSUE 3 Revised July 2010.

© Omega Diagnostics Ltd., 2010. **POLISH**



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY