

MONOKIT

کیت اندازه گیری **Free Testosterone** در سرم انسان
Free Testosterone ELISA Kit
 Cat. No: 5534-96 / Rev: B2 (1402/09/25)

مقدمه:

تستوسترون یک استروئید ۱۹ کربنه و یک آندروژن فعال است که در مردان بالغ و نرمال عمدتاً توسط بیضه‌ها ترشح می‌شود. تستوسترون مسئول ایجاد صفات ثانویه جنسی است و اندازه‌گیری آن در ارزیابی وضعیت هیپوگنادیسم اهمیت ویژه‌ای دارد. افزایش سطح تستوسترون در مقاومت کامل به آندروژن مشاهده می‌شود. از علل کاهش سطح تستوسترون می‌توان به هیپوگنادیسم، درمان با استروژن، سندرم کلایین فلتر، سیروز کبدی و غیره اشاره کرد. بخش عمده تستوسترون در جریان خون به پروتئین‌های حامل متصل می‌باشد. این هورمون به طور ضعیف به آلبومین، پروتئین اتصال‌ی به کورتیزول (CBP) و به-طور محکم به گلوبولین اتصال‌ی به هورمون‌های جنسی (SHBG) متصل می‌شود. بخش فعال تستوسترون شکل آزاد آن می‌باشد که همین امر دلیل تعیین غلظت هورمون آزاد به عنوان شاخص بهتر جهت تشخیص و پیگیری بیماری‌های مذکور باشد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری غلظت **Free Testosterone** در سرم انسان می‌باشد.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. با اضافه شدن تستوسترون کونژوگه شده با آنزیم **HRP**، سرم حاوی تستوسترون آزاد و سپس آنتی‌بادی بیوتینیل به چاهک‌های حاوی **استرپتاویدین** تثبیت شده، کمپلکس‌های ایمنی از طریق واکنش بیوتین با استرپتاویدین، به کف چاهک متصل می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم **HRP**) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج **۴۵۰** نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب در هر چاهک با غلظت **Free Testosterone** در سرم و کالیبراتورهای ارتباط معکوس دارد. در نهایت به کمک منحنی استاندارد غلظت این هورمون در نمونه‌ها محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورهای **Free Testosterone Cal A-G**: با غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۱، ۵، ۲/۵، ۴، ۶۰ ng/dL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (**Free Testosterone Enzyme Conjugate**): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی تستوسترون متصل به آنزیم **HRP** در بافر.

- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (**Free Testosterone Biotin Conjugate**): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد **Testosterone** متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول شستشو (**Wash Solution-50X**): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
- ۶) محلول رنگزا **A** (**Substrate Solution A**): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۷) محلول رنگزا **B** (**Substrate Solution B**): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۸) محلول متوقف‌کننده (**Stop Solution**): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
- ۹) محلول کنترل (**Free Testosterone Control**): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.

۱۰) بر حسب مخصوص پلیت یک ورق.

توجه ۱: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل آن‌ها و گواهی آنالیز محصول (**COA**) می‌باشد. تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه **COA** درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر **۴۵۰** و **۶۳۰** نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن **HIV1/2**، **HBsAg** و **HCV** بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
- ۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
- ۶) نمونه بیمار، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

- ۱) از نمونه‌های سرمی و پلاسمای هپارینه استفاده شود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن

- کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (**>5 mg/day**) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

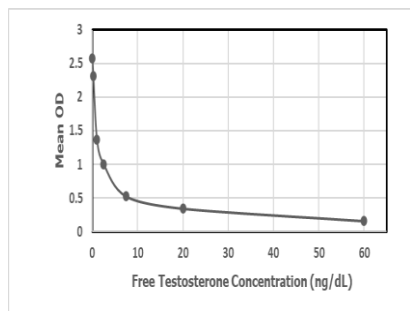
- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (**50X**) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در یخ‌خوار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا **A** و **B** را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا **A** را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا **B** اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- ۲) حجم ۲۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و یا کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کرده و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کرده و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
- ۵) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت^۱ اقدام نمایید.

- ۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها ریخته و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
- توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.
- ۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.
- ۹) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج **۴۵۰** نانومتر (حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش) بخوانید. در این آزمایش محاسبه غلظت به روش **Point to Point** و **4PL** (یا **Logic-log**) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش **4PL** غلظت کالیبراتور **A** را عددی کوچک (به‌عنوان مثال **0.01 ng/dL**) در نظر بگیرید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Value (ng/dL)
Cal. A	A1	2.537	2.579	0
	B1	2.621		
Cal. B	C1	2.243	2.311	0.2
	D1	2.379		
Cal. C	E1	1.425	1.368	1
	F1	1.311		
Cal. D	G1	1.1	1.083	2.5
	H1	1.067		
Cal. E	A2	0.503	0.523	7.5
	B2	0.544		
Cal. F	C2	0.314	0.344	20
	D2	0.375		
Cal. G	E2	0.143	0.158	60
	F2	0.173		



¹ <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای Free Testosterone

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Reference Interval	
Males	2.5 – 20 ng/dL
Females	0.4 – 2 ng/dL
1 ng/dL = 10 pg/mL	

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت – آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/dL)	1.3	15.1	35.8	0.92	3.36	25.71
SD (ng/dL)	0.07	0.76	1.55	0.05	0.17	1.15
CV (%)	5.3	5	4.3	5.4	5.0	4.5

۲) بررسی دقت – آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/dL)	0.94	16.1	38.8	0.91	3.38	25.41
SD (ng/dL)	0.06	0.93	1.56	0.05	0.17	0.97
CV (%)	6.3	5.7	4.0	5.5	5.0	3.8

۳) بررسی درستی – آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به اژه هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت Free Testosterone در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/dL)	Added (ng/dL)	Exp. (ng/dL)	Obs. (ng/dL)	% Rec.
1	4.6	19.1	11.85	11.79	99.4
2	17.1	33.5	25.3	25.4	100.3
3	37.3	3.91	20.6	20.7	100.4

۴) بررسی درستی – آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت Free Testosterone در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/dL)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
1	2.1	4.9	5.6	6.1	4.7	7.3
2	12.68	3.1	2.3	5.6	-3.9	-3
3	31.18	-5.4	4.7	-3.4	2.5	4.8

۵) بررسی درستی – مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Free Testosterone در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش Free Testosterone مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\% \text{ تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله}}{\text{درصد تداخل}}$$

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین تا ۵۰۰، بیلی‌روبین تا ۱۵ و تری‌گلیسرید تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند؛ هر چند به‌طور عمومی توصیه بر این است که از نمونه‌های لیپمیک استفاده نشود.

۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of (LOB) Blank با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $ng/dL \pm 0.06$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SDs$$

$$LOB = Meanb + 1.645 SDb$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۸) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

۹) بررسی ویژگی – آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار تستوسترون مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Substances	Cross Reactivity
Testosterone	1.000
Androstenedione	0.0009
Dihydrotestosterone	0.0178
Cortisone	< 0.0001
Corticosterone	< 0.0001
Cortisol	< 0.0001
Spironolactone	< 0.0001
Progesterone	< 0.0001
17 OH Progesterone	< 0.0001
DHEA sulfate	< 0.0001
Estradiol	< 0.0001
Estron	< 0.0001
Estriol	< 0.0001
Hemolysis	< 0.0001
Rubella	< 0.0001

علامت استفاده شده در برجسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.