

کیت اندازه‌گیری Testosterone در سرم انسان
Testosterone ELISA Kit 96t
Cat. No: 2424-96 / Rev: A3 (1402/09/22)

مقدمه:

تستوسترون یک هورمون استروئیدی ۱۹ کربنه است که سنتز آن در مردان از هفته هفتم جنینی آغاز شده و در دوران بلوغ به اوج خود می‌رسد. حدود ۹۵٪ از تستوسترون موجود در خون مردان بالغ توسط سلول‌های لایدیگ بیضه و مابقی از طریق تبدیل پیش‌سازهای آن (دی‌هیدرو اپی‌آندروسترون و آندروستن‌دیون) به هورمون اصلی در گردش خون محیطی تولید می‌شود. تستوسترون در زنان، توسط بافت چربی، قشر آدرنال و تخمدان‌ها ساخته می‌شود. معمولاً این هورمون جهت تشخیص بلوغ زودرس و عقیمی در مردان، ویریلیزاسیون در زنان و به عنوان تومور مارکر جهت تشخیص تومورهای تخمدان یا بیضه اندازه‌گیری می‌شود. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری غلظت تستوسترون در سرم یا پلاسما انسان می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی در سطح چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده ضدتستوسترون صورت می‌گیرد. در این آزمایش نمونه سرم، کالیبراتور و یا کنترل که حاوی تستوسترون طبیعی (غیرکونژوگه) است به‌همراه تستوسترون کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) و آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. هرچه مقدار تستوسترون نمونه بیشتر باشد، هورمون کونژوگه کمتری به آنتی‌بادی متصل شود. 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، با غلظت تستوسترون نمونه و کالیبراتور‌ها، نسبت معکوس دارد. در نهایت، غلظت تستوسترون موجود در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده، ۹۶ تستی.
 - ۲) کالیبراتور‌ها (Testosterone Cal A-G): هفت ویال با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۲ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) کونژوگه آنزیمی (Testosterone Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) کونژوگه بیوتینی (Testosterone Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی بیوتین متصل به آنتی‌بادی 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 (Testosterone Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۱۰) بر چسب مخصوص پلیت یک ورق.
- توجه ۱: 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 COA درج شده 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 بیماران، 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) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما می‌باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. 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 بالای از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) 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 بن‌ماری 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 ۱۰ میکرولیتر از کالیبراتور‌ها، کنترل‌ها یا نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببشویید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون 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 به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

1. <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

(Stability) بررسی پایداری

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 به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

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

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
 2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
 3. 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.

(Linearity) بررسی درستی - آزمون خطی بودن

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

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
1	1.24	-1.8	2.0	-1.6	-2.1
2	7.37	-0.4	-2.0	2.7	-1.3
3	9.80	0.4	-0.7	-1.5	1.7

(Cross Reactivity) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع

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 100 ± 1% درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا 25 درصد است.

Substances	Cross Reactivity
Testosterone	1
Androstenedione	0.0009
Dihydrotestosterone	0.0178
Cortisone	<0.0001
Corticosterone	<0.0001
Cortisol	<0.0001
Spirolactone	<0.0001
Progesterone	<0.0001
17α-OH Progesterone	<0.0001
DHEA sulfate	<0.0001
Estradiol	<0.0001
Estrone	<0.0001
Estriol	<0.0001
Hemolysis	<0.0001
Rubella	<0.0001
Lipemia	<0.0001

(Sensitivity) بررسی حساسیت

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

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای تستوسترون

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	
Boys Before Puberty	0.1 – 3.7 ng/mL
Male	2.5 - 10 ng/mL
Female	0.2 – 0.95 ng/mL

پارامترهای کنترل کیفی

(Within Run) بررسی دقت - آزمون دقت درون‌دور

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (ng/mL)	0.92	3.41	10.06
S.D. (ng/mL)	0.05	0.17	0.45
C.V (%)	5.4	5.0	4.5

(Between Run) بررسی دقت - آزمون دقت بین‌دور

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (ng/mL)	1.21	4.82	7.45
S.D. (ng/mL)	0.07	0.24	0.31
C.V (%)	5.8	5.0	4.2

(Recovery) بررسی درستی - آزمون بازیابی

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

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	2.51	8.13	5.32	5.52	103.8
2	3.34	0.76	2.05	2.11	102.9
3	0.86	10.71	5.78	5.64	97.6

توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان آنکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

(۸ حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۹ شدت جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). 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/mL) در نظر بگیرید.

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.417	2.420	0
	B1	2.423		
Cal. B	C1	2.352	2.341	0.1
	D1	2.331		
Cal. C	E1	1.795	1.802	0.5
	F1	1.810		
Cal. D	G1	1.313	1.317	1
	H1	1.321		
Cal. E	A2	0.830	0.827	2.5
	B2	0.825		
Cal. F	C2	0.566	0.561	5
	D2	0.557		
Cal. G	E 2	0.333	0.330	12
	F 2	0.328		

