

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИГИДРОТЕСТОСТЕРОНА

CAN-DHT-280, Dihydrotestosterone ELISA

Каталог. № : **CAN-DHT-280**
Производитель: **Diagnostics Biochem
Canada Inc., (Канада)**

Методика от **09-05-2014**
Версия **5.0**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для использования в исследовательских целях
Не для использования в диагностике**

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения дигидротестостерона в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на обычном иммуноферментном анализе с использованием конкурентного связывания. Немеченый антиген (дигидротестостерон, присутствующий в образцах, контролях и стандартах) и меченый ферментом антиген (конъюгат) во время инкубации конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. Затем, после промывки, добавляется ферментный субстрат. Энзиматическая реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора. Интенсивность окрашивания, сформировавшегося в ходе энзиматической реакции, обратно пропорциональна концентрации дигидротестостерона в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация дигидротестостерона в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

5 α -дигидротестостерон (DHT) – это стероид, подобный тестостерону и андростенедиону, которые принадлежат классу андрогенов. DHT является C19 стероидом и проявляет андрогенную активность. Основная масса андрогенов продуцируется клетками Лейдига яичек. В кровотоке андрогены циркулируют в связанном с белками виде, в особенности с секс гормон-связывающим глобулином (SHBG) и альбумином. В крови циркулируют также следовые количества этих стероидов в несвязанном виде, так называемые свободные фракции. Аффинность связывания DHT с SHBG как минимум в три раза выше, чем у тестостерона. У мужчин примерно 70% DHT продуцируется при периферическом превращении тестостерона, тогда как у женщин большая часть DHT происходит из андростендиона. Главным органом, нейтрализующим андрогены, является печень. Следовательно, в печени стероидные гормоны подвергаются структурным модификациям, которые в общем случае считаются предварительными условиями их биологической инактивации. Некоторые образующиеся метаболиты возвращаются в кровоток перед их экскрецией почками. Таким образом, элиминирование стероидов из организма происходит с мочой.

Клинические показания:

- При синдроме Кляйнфельтера уровень DHT значительно ниже, чем у здоровых мужчин
- При идиопатическом гирсутизме примерно у 40% пациенток уровень DHT повышен
- При синдроме поликистозных яичников (PCO) примерно у 35% пациенток выявляется повышенный уровень DHT
- Уровень DHT у молодых людей значительно выше, чем концентрации гормона, присутствующие у здоровых пожилых людей, следовательно, продукция андрогенов повышена в пубертатном периоде, что ведет к нарастанию маскулинизации. Было продемонстрировано, что яички человека продуцируют DHT, который образуется в семьях выводящих канальцах. Следовательно, при повреждениях канальцев продукция DHT снижается, что является причиной понижения уровня DHT в плазме (пациенты с герминогенной аплазией и азооспермией)
- У пациентов, страдающих анорхизмом, уровень DHT очень низкий

- Было показано, что при некоторых опухолях простаты (особенно u1085 на стадии D) определение DHT может быть полезным фактором прогноза ответа на антиандрогенную терапию.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток с высоким и низким значениями должны быть включены в каждую постановку для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо надевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
5. Все образцы и реагенты набора должны достигать комнатной температуры и быть аккуратны, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроли должны быть включены в каждую постановку. Их значения, полученные при тестировании, должны соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученный для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в виде окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения DHT в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения DHT в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Для разведения сывороток с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
5. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Сыворотка человека, которая могла быть использована при приготовлении реагентов, стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими TMB, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. TMB может быть канцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 0.2 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. Храните при 4 °С не более 24 часов. Для более длительного хранения необходимо заморозить образец при температуре -10 °С или ниже. Считайте все образцы человеческого происхождения потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Подготовка образцов не требуется.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Дозаторы на 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Микропланшетный шейкер
5. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более* (см. шаг 10 процедуры)

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими антителами анти-DHT (с «ломаемыми» стрипами) - 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый поликлональными антителами в закрываемом пакете с осушителем. Готов к использованию.
Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С
Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

2. Концентрат конъюгата DHT-пероксидаза хрена (HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат DHT-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.
Объем: 200 мкл во флаконе
Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С
Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести концентрат в соотношении 1:100 в рабочем буфере (например, 20 мкл HRP в 2 мл буфера для анализов). При использовании всего микропланшета разведите 120 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Калибраторы DHT - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих DHT в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением известных количеств DHT в матрикс.

* В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Калибратор	Концентрация (пг/мл)	Объем/флакон (мл)
Калибратор А	0	2.0
Калибратор В	25	0.6
Калибратор С	100	0.6
Калибратор D	500	0.6
Калибратор E	1000	0.6
Калибратор F	2500	0.6

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия калибраторы должны быть использованы в течение 14 дней или

аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

4. Контроли – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие DHT в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен с добавлением определенного количества DHT в буфер. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.

Объем: 0.6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2-8 °С

Стабильность: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 флакон, содержащий буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 50 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2-8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера 450 мл воды.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 15 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

7. Субстрат ТМБ – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

8. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий 1M серной кислоты.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Подготовка образцов:

Не требуется.

Все реагенты привести к комнатной температуре перед использованием. Калибраторы. Контроли и образцы должны тестироваться в дублях. Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовить рабочие растворы конъюгата DHT-HRP и промывочного буфера.
2. Отделить требуемое количество микролуночных полосок. Неиспользуемые полоски запечатать обратно в пакет и поместить в холодильник.
3. Пипетировать по 50 мкл калибратора, контроля и образца в дублях в помеченные ячейки.
4. Пипетировать 100 мкл конъюгата рабочего раствора в каждую лунку (рекомендуется использование мультиканальной пипетки).
5. Аккуратно встряхнуть планшет в течение 10 секунд и инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (без встряхивания).
6. Промыть лунки 3 раза с 300 мкл разбавленного промывочного раствора на каждую лунку и постучать микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедиться, что он сухой (рекомендуется использование автоматического промывочного устройства).
7. Пипетировать 150 мкл Субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковой скоростью.
8. Аккуратно встряхнуть планшет в течение 10 секунд и инкубировать в течение 10-15 минут при комнатной температуре (без встряхивания) (или до тех пор, пока калибратор А не достигнет темно-синего окраса для необходимой ОП).

9. Пипетировать 50 мкл стоп раствора в каждую лунку с одинаковой скоростью как в шаге 7.
10. Определить ОП ячеек с помощью микропланшетного ридера при 450 нм в течение 20 минут после добавления стоп раствора.

*если ОП выходит за верхний предел обнаружения или если фильтр в 450 нм недоступен, можно использовать фильтр с длиной волны 405 или 415 нм. ОП будут ниже, но это не повлияет на результаты.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

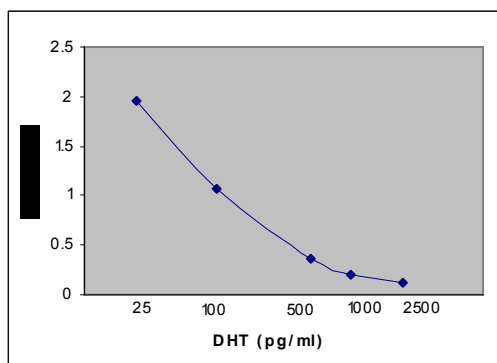
1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
2. Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности калибраторов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
3. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
4. Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
5. Если результат превышает 2500 пг/мл, образец необходимо развести стандартом А в соотношении не более чем 1:8. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (пг/мл)
A	2.320	2.279	2.300	0
B	1.976	1.928	1.952	25
C	1.058	1.077	1.068	100
D	0.359	0.354	0.357	500
E	0.222	0.205	0.214	1000
F	0.131	0.128	0.130	2500
неизвестный	0.515	0.507	0.511	300

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность:

Нижний предел обнаружения рассчитан исходя из калибровочной кривой вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого стандарта (стандарт А), измеренного 10 раз. Чувствительность метода dbc Direct DHT ELISA составила **6.0 пг/мл**.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы на перекрестную реактивность с помощью данного метода, при 100% перекрестной реактивности для DHT ELISA:

Стероид	Перекрестная реактивность, %
Дигидротестостерон	100
Тестостерон	8.7
5β Дигидротестостерон	2.0
Андростендион	0.2

Кроме того, следующие перечисленные соединения были протестированы и перекрестная реактивность составила менее 0.01%: сульфат дигидроэпиандростерона, 17β-эстрадиол, эстриол, эстрон, прогестерон, 17-ОН прогестерон, кортизол и прегненолон.

Точность внутри серии:

3 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	236.74	26.89	11.4
2	869.03	47.41	5.46
3	1008.14	39.36	3.90

Точность между сериями:

3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 4 недель. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	280.88	34.07	12.1
2	721.40	54.20	7.5
3	1025.41	60.45	5.9

Воспроизводимость

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств ДНТ к трем образцам сывороток пациентов. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1 ненасыщенный	290.54	-	-
	+117.53	408.07	88.6
	+235.06	525.60	95.4
	+470.13	760.67	97.9
2 ненасыщенный	324.75	-	-
	+117.53	442.29	88.0
	+235.06	559.81	90.3
	+470.13	794.88	89.6
3 ненасыщенный	720.11	-	-
	+117.53	837.64	90.5
	+235.06	955.17	89.7
	+470.13	1190.24	85.1

Линейность

3 образца сывороток пациентов были разведены калибратором А. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1	340.67	-	-
	1:2	170.34	97.1
	1:4	85.17	112.0
	1:8	42.58	113.8
2	1086.01	-	-
	1:2	543.00	93.7
	1:4	271.50	85.5
	1:8	135.75	84.7
3	1313.21	-	-
	1:2	656.61	93.4
	1:4	328.30	97.1
	1:8	164.15	82.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИЗУЧЕНИЯ

Метод dbc Direct DHT ELISA (набор А) сравнивался с набором RIA (набор В). Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Группа	N	Набор А Среднее значение	Набор В Среднее значение
Женщины	10	95.5	99.0
Мужчины	10	280.0	252.0

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

Группа	Интервал (пг/мл)
Женщины:	
предклимактерический	24-368
послеклимактерический	10-181
Мужчины	250-990



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com