

Инструкции по использованию  
ELISA



LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

**Инструкция по применению дигидротестостерон  
ELISA**

**AA E-1700**

---

## **ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ**

Иммунологический анализ для прямого количественного определения дигидротестостерон фермента в сыворотке крови человека. Только для *in vitro* использования.

## **ПРИНЦИП МЕТОДА**

Принцип следующего иммуноферментного анализа следует типичному сценарию конкурентного связывания. Конкуренция происходит между немеченым антигеном (присутствует в стандартах, контролях и образцах пациентов) и фермент-меченым антигеном (конъюгат) для ограниченного числа антител связывания на планшете. Процедуры промывки и декантирования удаления несвязанных материалов. После стадии промывки, добавляется субстрат фермента. Ферментативная реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Оптическая плотность измеряется на ИФА-ридере. Интенсивность образовавшегося цвета обратно пропорциональна концентрации ДГТ в образце. Набор стандартов используется для построения стандартной кривой, из которой количество ДГТ в образцах пациента и контроля могут быть непосредственно считаны.

## **Клиническое применение**

5-альфа-дигидротестостерон (ДГТ) является стероидом, подобно тестостерону и андростендиону, которые принадлежат к классу под названием андрогены. ДНТ является С19 стероидом и обладает андрогенной активностью. Основная часть производства андрогенов происходит, главным образом, в клетках Лейдига семенников. Андрогены циркулируют в крови, связывается с белками, особенно половой гормон связывающего глобулина (SHBG) и альбумин. Следовое количество этих стероидов циркулируют в несвязанной форме в крови и называются свободными фракциями. ДНТ имеет по крайней мере три раза сродство связывания к SHBG, чем тестостерон. У мужчин около 70% ДГТ происходит от периферического превращения тестостерона, в то время как у женщин большинство ДГТ происходит от андростендиона. Основным органом для нейтрализации андрогенов является печень. Поэтому в печени стероидные гормоны подвергаются структурным изменениям, которые, как правило, рассматриваются в качестве предпосылок для их биологической инактивации. Некоторые метаболиты образуются и некоторые возвращаются в обращение до почечной экскреции. Таким образом, ликвидация стероидов из организма осуществляется через мочу.

Клинические тенденции:

- При синдроме Клайнфельтера уровень ДНТ значительно ниже, чем найденный у нормальных мужчин.
- при идиопатическом гирсутизме около 40% пациентов имеют повышенный уровень ДГТ.
- при поликистозных яичниках (ЦУП) около 35% пациентов имеют повышенный уровень ДГТ.
- Уровень ДГТ у молодых людей гораздо выше, чем у нормальных пожилых людей, следовательно, увеличение производства андрогена в период полового созревания повышает маскулинизацию характеристик. Было продемонстрировано, что человеческие семенники производят ДНТ, который появляется в семенных канальцах. Поэтому в трубчатом повреждении производство ДНТ ухудшается, что приводит к снижению уровня ДНТ плазмы (пациенты с зародышевой аплазией клеток и азооспермией).
- уровень ДГТ плазмы у больных анорхией очень низкий.
- Было сообщено, что при раке предстательной железы (особенно в стадии D) определения ДНТ может быть полезным в прогнозировании ответа для анти-андрогенной терапии.

## **Процедурные предостережения и предупреждения**

- Пользователи должны иметь глубокое понимание этого протокола для успешного использования этого набора, надежная производительность будет достигнута только путем строгого и тщательного соблюдения инструкции.
- контрольные материалы или емкости сыворотки должны быть включены в каждом запуске на высоком и низком уровне для оценки достоверности результатов.

- Когда использование воды определяется для разбавления или восстановления, используют деионизированную или дистиллированную воду.
- Для того чтобы уменьшить воздействие потенциально вредных веществ, следует надевать перчатки при обращении с набором реагентов и человеческими образцами.
- Все реагенты набора и образцы должны быть доведены до комнатной температуры и осторожно, но тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторного замораживания и размораживания реагентов и образцов.
- Кривая калибратор должна быть установлена для каждого запуска.
- Контроли должны быть включены в каждом прогоне и падение в пределах установленных лимитов доверия.
- Неправомерные процедурные методы, неточное прокапывание, неполная промывка, а также неправильное хранение реагентов может быть указано, когда значения анализа для контроля не отражают установленные диапазоны.
- При чтении микропланшета, наличие пузырьков в лунках будет влиять на оптические плотности (ОП). Осторожно удалите пузырьки перед выполнением шага чтения.
- Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при хранении надлежащим образом. Нестабильность или загрязнение может быть обозначено развитием голубого цвета, и в этом случае раствор не должен быть использован.
- При дозировании субстрата и стоп-раствора, не используйте пипеток, в которых эти жидкости придут в контакт с любыми металлическими частями.
- Для предотвращения загрязнения реагентов, используйте новый одноразовый наконечник пипетки для дозирования каждого реагента, образца, стандарта и контроля
- Не следует смешивать различные номера лотов компонентов набора в тесте и не используют какой-либо компонент после истечения срока годности, указанного на этикетке
- Набор реагентов следует рассматривать как опасные отходы и утилизировать в соответствии с национальным законодательством

## **ОГРАНИЧЕНИЯ**

Все реагенты в наборе откалиброваны для прямого определения ДГТ в сыворотке крови человека. Комплект не калибруется для определения ДНТ в слюне, плазме или других образцах человека или животных.

- Не использовать сильно гемолизированные, липемические, желтушные образцы или неправильно хранившуюся сыворотку крови.
- Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид или тиомерсал не совместимы с этим набором, так как они могут привести к ложным результатам.
- Только калибратор А может быть использован для разбавления каких-либо высоких образцов сыворотки. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
- Результаты, полученные с помощью этого комплекта никогда не должны использоваться в качестве единственной основы для клинического диагноза. Например, возникновение гетерофильных антител у пациентов, регулярно подвергаются воздействию животных или продуктов животного происхождения имеет потенциал, вызывая помехи в иммунологических тестах. Следовательно, клиническая диагностика должна включать в себя все аспекты фона пациента, включая частоту воздействия животных/продуктов животного происхождения, если ложные результаты подозреваются.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ**

### **Потенциально биологически опасные материалы**

Сыворотка крови человека, которая может быть использована при подготовке стандартов и контролей была протестирована и выявлено, что не реагирует на поверхностный антиген вируса гепатита В, а также была протестирована на наличие антител к HCV и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и результаты оказались отрицательными. Однако ни один метод тестирования не может полностью гарантировать, что ВИЧ, гепатит С и вирус гепатита В или какие-либо инфекционные агенты отсутствуют. Реагенты следует рассматривать как потенциальную биологическую опасность и обращаться с теми же мерами предосторожности применительно к любому контакту с образцами крови.

### **Химическая опасность**

Избегайте контакта с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и серную кислоту. При контакте с любым из этих реагентов промыть большим количеством воды. ТМВ является подозреваемым канцерогеном.

### **Образцы - сбор и хранение**

Приблизительно 0,2 мл сыворотки требуется определение в дублях. Отобрать 4-5 мл крови в предназначенную помеченную пробирку и дать свернуться. Центрифугировать и тщательно удалить слой сыворотки. Хранить при температуре 4 оС до 24 часов или при температуре от -10 ° С или ниже, если анализы должны быть сделаны в более поздний срок. Рассматриваем все образцы крови человека в качестве возможных материалов и биологически опасных, необходимо принять соответствующие меры предосторожности при обращении.

### **ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ**

Этот анализ является прямой системой; образцы не требуют предварительной обработки.

### **РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ**

- прецизионные микропипетки с одноразовыми наконечниками на 50, 100, 150 и 300 мкл;
- дистиллированная или деионизированная вода;
- микропланшетный шейкер;
- Микропланшетный анализатор с фильтром, установленным на длине 450 нм и пределом ОП 3.0 или больше ( см процедуру анализа шаг 10).

### **РЕАГЕНТЫ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ**

#### **AA E-0030 Концентрат промывочного буфера – x10 WASH CONC 10 x**

Содержит: 1 бутылка с не ионным промывочным раствором и консервантом, не содержащим ртуть.

Объём: 50 мл/бутылка

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

Способ приготовления: Перед использованием разведите дистиллированной или деионизированной водой 1:10. Если будет использован весь планшет, то разбавьте 50 промывочного буфера с 450 мл воды.

#### **AA E-0055 ТМВ-субстрат – Готов к использованию SUBSTRATE**

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

Объём: 16 мл/флаконе

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

#### **AA E-0080 Стоп-раствор Stopping solution**

Содержит: 1 флакон, содержащий 1 М серной кислоты.

Объём: 6 мл/флаконе

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

### **Стандарты и контроли**

#### **Готовы к использованию.**

Содержит: шесть флаконов содержащих сыворотку с ДГТ в основном буфере с консервантом не содержащем ртуть. Содержат заданные концентрации ДГТ в буферном растворе.

Ниже приведены примерные концентрации, пожалуйста, обратитесь к этикетке на флаконе для точной концентрации:

Кат.номер	Стандарт	Концентрация	Объём
<b>AA E-1701</b>	<b>Стандарт А</b>	0 пг/мл	2,0 мл
<b>AA E-1702</b>	<b>Стандарт В</b>	25 пг/мл	0,6 мл
<b>AA E-1703</b>	<b>Стандарт С</b>	100 пг/мл	0,6 мл
<b>AA E-1704</b>	<b>Стандарт D</b>	500 пг/мл	0,6 мл
<b>AA E-1705</b>	<b>Стандарт Е</b>	1000 пг/мл	0,6 мл
<b>AA E-1706</b>	<b>Стандарт F</b>	2500 пг/мл	0,6 мл
<b>AA E-1751</b>	<b>Контроль 1</b>	Согласно этикеткам флаконов для ожидаемого объема и приемлемого диапазона	0,6 мл
<b>AA E-1752</b>	<b>Контроль 2</b>		0,6 мл

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке. Открытые стандарты должны быть использованы в течении 14 дней или разделены и заморожены. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания

#### **AA E-1713 Буфер для анализа – Готов к использованию ASSAY Buffer**

Содержит: 1 флакон, содержащий основной белковый буферный раствор с консервантом, не содержащим ртути.

Объём: 15 мл/флаконе

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

#### **AA E-1731 Разборный микропланшет, покрытый кроличьими анти-ДГТ антителами.**

Готов к использованию

Содержит: Один 96 луночный (12x8) микропланшет с поликлональными антителами в закрывающемся пакете с осушителем.

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

#### **AA E-1740 Концентрированный конъюгат ДГТ-HRP – x100 CONJUGATE-CONC 100[**

Содержит: конъюгат ДГТ-HRP в белковом растворе с консервантом, не содержащем ртути.

Объём: 200 мкл/флаконе

Хранение: 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке

Способ приготовления: развести 1:100 с буфером для анализа перед использованием (например, 20 мкл концентрата в 2 мл буфера). Если будет использоваться весь планшет, то нужно развести 120 мкл концентрата в 12 мл буферного раствора для анализа. Не использовать, что осталось.

#### **Процедура анализа**

Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Стандарты, контроли и образцы проб должны быть исследованы в дублях. Как только процедура начата, все этапы должны быть завершены без перерыва.

1. Приготовьте рабочие растворы HRP конъюгата и промывочного буфера.
2. Извлеките необходимое количество стрипов. Неиспользованные поместите обратно в упаковку, герметично закупорьте и поместите в холодильник.
3. Добавьте 50 мкл каждого стандарта, контроля и образца сыворотки в соответствующие лунки в дублях.
4. Добавьте 100 мкл рабочего раствора HRP конъюгата в каждую лунку (рекомендуем использовать многоканальную пипетку)
5. Аккуратно встряхните пластину микропланшета в шейкере в течение 10 сек. И инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре.

6. Промойте каждую лунку по 3 раза: внося по 300 мкл раствора промывочного буфера, удаляя остатки влаги абсорбирующей бумагой (мы рекомендуем использовать вошер).
7. Добавьте 150 мкл ТМБ-субстрата в каждую лунку через заданные интервалы времени
8. Аккуратно встряхните пластину микропланшета в шейкере в течение 10 сек  
Инкубируйте при комнатной температуре 10-15 минут при комнатной температуре (или до того момента, когда Стандарт А приобретет темно-синий цвет, достигнет желаемой ОП)
9. Добавьте 50 мкл Стоп-раствора в каждую лунку через те же интервалы, что и в этапе 7
10. Считайте результат на микропланшетном ридере при 450 нм в течение 20 минут после добавления Стоп-раствора.  
(Если оптическая плотность превышает верхний предел обнаружения или фильтр 450 нм недоступен, то можно заменить на фильтр 405 или 415нм. Оптические плотности будут ниже, однако, это не повлияет на результаты пациентов/контрольные пробы.)

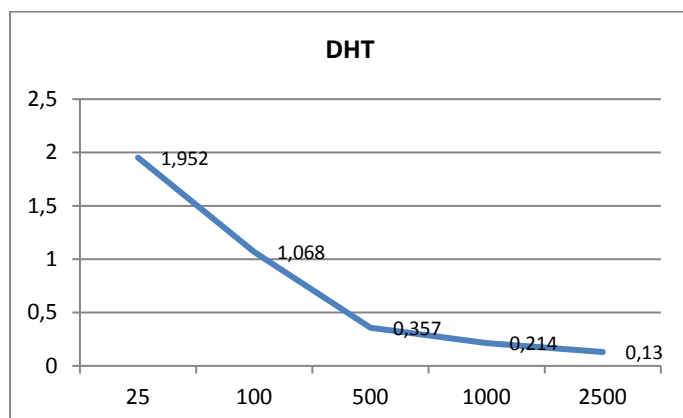
### Расчет результатов

1. Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта в дублях
2. Нарисуйте калибровочную кривую на логарифмической бумаге со средней оптической плотности на Y-оси и концентрацией калибратора на X-оси. Если для анализа используется программное обеспечение, то рекомендуется кривая на 4-параметра.
3. Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого неизвестного в дублях.
4. Рассчитайте значение неизвестных при помощи калибровочной кривой.
5. Если образец получается более 2500 пг/мл, то разведите его Калибратором А в соотношении не более 1:8. Полученный результат следует умножить на фактор разведения.

Типичная таблица (не используйте для расчета)

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Концентрация (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
Неизвестная	0.515	0.507	0.511	300

Типичная калибровочная кривая (не используйте для расчета)



### Характеристики исполнения

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ:** 6,0 пг / мл.

### Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие соединения были протестированы на перекрестную реактивность с комплектом прямого дигидротестостерон ELISA с дигидротестостерон перекрестно реагирующим на 100%.

Стероид	% кросс Реактивность
дигидротестостерон	100
тестостерон	8,7
5 & beta; дигидротестостерон	2,0
андростендион	0,2

Следующие стероиды были протестированы, но перекрестно реагировали менее 0,01%: дегидроэпиандростерон сульфат, 17 & beta; Эстрадиол, эстриол, эстрон, прогестерон, 17-ОН прогестерон, кортизол и Прегненолон.

### INTRA- анализ точность

Три образца анализировали в десять раз каждый по той же стандартной кривой. Результаты (в пг / мл) приведены ниже:

Образец	значение	SD	CV%
1	236,74	26,89	11,4
2	869,03	47,41	5,46
3	1008,14	39,36	3,90

### INTER- анализ точность

Три образца анализировали в десять раз в течение четырех недель. Результаты (в пг / мл) приведены ниже:

Образец	значение	SD	CV%
1	280,88	34,07	12,1
2	721,40	54,20	7,5
3	1025,41	60,45	5,9

### ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Пиковые образцы были приготовлены путем добавления определенных количеств DHT на трех образцах сыворотки пациента. Результаты (В пг / мл) приведены ниже:

образец	Набл результат	Ожид результат	Восстановление %
1 непииковый	290,54	-	-
+117,53	361,51	408,07	88,6
+235,06	501,66	525,60	95,4
+470,13	744,81	760,67	97,9
2 непииковый	324,75	-	-
+117,53	389,43	442,29	88,0
+235,06	505,23	559,81	90,3
+470,13	712,44	794,88	89,6
3 непииковый	720,11	-	-
+117,53	758,13	837,64	90,5
+235,06	856,46	955,17	89,7
+470,13	1013,61	1190,24	85,1

## ЛИНЕЙНОСТЬ

Три образца сыворотки пациента были разведены стандарт А. Результаты (в пг / мл) приведены ниже

образец	Набл результат	Ожид результат	Восстановление %
1	340,67	-	-
1:2	165,35	170,34	97,1
1:4	95,39	85,17	112,0
1:8	48,47	42,58	113,8
2	1086,01	-	-
1:2	508,58	543,00	93,7
1:4	232,11	271,50	85,5
1:8	114,95	135,75	84,7
3	1313,21	-	-
1:2	612,98	656,61	93,4
1:4	318,63	328,30	97,1
1:8	134,98	164,15	82,2

## СТАДИИ СРАВНЕНИЯ

Прямой дигидротестостерон ELISA набор (набор А), сравнивали с конкурентами с покрытием трубки RIA комплект (комплект В). Результаты (в пг / мл) приведены ниже:

группа	Кол-во	Набор А значение	Набор В значение
женщины	10	95,5	99,0
мужчины	10	280,0	252,0

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ НОРМАЛЬНЫЕ

Что же касается всех клинических анализов, каждая лаборатория должна собрать данные и создать свой собственный диапазон нормальных значений.

Группа	Диапазон (пг/мл)
Мужчины	250-990
Пременопауза (женщины)	24-368
Постменопауза (женщины)	10-181

### Литература

- Bassett, R.M., A simple chromatographic method for the radioimmunoassay of four androgenic steroids. Medical Laboratory Sciences, 37: 31, 1980.
- Baxendale, P.M., et al., Plasma and salivary androstenedione and dihydrotestosterone in women with hyperandrogenism. Clinical Endocrinology, 18: 447, 1983.
- Brooks, R.V., Androgens. Physiology and Pathology. In: Makin, H.L. J., ed., Biochemistry of Steroid Hormones, 2nd ed., Oxford Blackwell Scientific Publications, 565: 1984.
- Cameron, E.H.D., In proceedings of the fifth tenovous workshop, Steroid Immunoassay, ed., Cameron, E.H.D., et al., Alpha Omega Publishing Cordiff, 1975.
- Dunn, J.F., et al, Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 endogenous steroids to both SHBG and CBG in human plasma. J. Clin. Endocr. Metab. 53: 58, 1981.
- Hammond, G.L., et al, The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermatic and peripheral venous blood. J. Clin. Endocr. Metab. 45: 16, 1977.
- Ito, T., et al, Dihydrotestosterone in human peripheral plasma. J. Clin. Endocr. 31: 362, 1970.
- Mean, F., et al, Study of the binding of dihydrotestosterone, testosterone and oestradiol with sex hormone binding globulin. Clinica Cemica Alta 80: 171, 1977.
- Mooradian, A.D., et al, The biological actions of androgens. Endocr. Rev. 8: 1-28, 1987.
- Pazzagli, M., et al, Radioimmunoassay of plasma dihydrotestosterone in normal and hypogonadal men. Clin. Endocr. 82: 380, 1976.
- Wakelin, K., et al, Relationship of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone to testosterone in health and disease. J. Endocrinol. 87: 450, 1980.
- Wang, C., et al, Solitary androgens in hirsutism: Are they of use in routine evaluation. Ann. Clin.



Biochem.23:590, 1986.

• Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin. Chemistry 45:7, 1999.

• Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

**Условные обозначения:**

 Температура хранения	 Производитель	 Содержит достаточно для <N> испытаний
 Дата окончания срока действия	<b>LOT</b> Код партии	<b>IVD</b> Только для диагностики в лабораторных условиях!
 Обратитесь к инструкции по пользованию	<b>CONT</b> Содержание	<b>CE</b> Маркировка