



**IMMUNOASSAYS AND SERVICES**

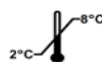
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

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

## Інструкція з використання Дигідротестостерон ІФА

**REF**

**AA E-1700**



96

**IVD**

**CE**

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

## **ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ**

Імуноферментний аналіз для прямого кількісного визначення дигідротестостерону в сироватці крові людини. Тільки для in vitro використання.

## **ПРИНЦИП МЕТОДУ**

Принцип наступного імуноферментного аналізу відповідає типовому сценарію конкурентного зв'язування. Конкуренція відбувається між неміченим антигеном (присутнє в стандартах, контролях і зразках пацієнтів) і фермент-міченим антигеном (кон'югатом) для обмеженого числа антитіл зв'язування на планшеті. Процедури промивання і спорожнювання видаляють незв'язані матеріали. Після стадії промивання, додається субстрат ферменту. Ферментативна реакція зупиняється додаванням стоп-розчину. Оптична густина вимірюється на ІФА-рідері. Інтенсивність утвореного кольору обернено пропорційна концентрації ДГТ в зразку. Набір стандартів використовується для побудови стандартної кривої, з якої кількість ДГТ в зразках пацієнта і контролю можуть бути безпосередньо зчитані.

## **Клінічне застосування**

5-альфа-дигідротестостерон (ДГТ) є стероїдом, подібно тестостерону і андростендіону, які належать до класу під назвою андрогени.

ДГТ є C19 стероїдом і володіє андрогенною активністю. Основна частина виробництва андрогенів відбувається, головним чином, в клітинах Лейдіга насінників. Андрогени циркулюють в крові, зв'язуються з білками, особливо статевий гормон глобуліну (SHBG) і альбумін. Слідові кількості цих стероїдів циркулюють в незв'язаній формі в крові і називаються вільними фракціями. ДГТ має принаймні три рази спорідненість зв'язування до SHBG, ніж тестостерон. У чоловіків близько 70% ДГТ походить від периферичного перетворення тестостерону, в той час як у жінок більшість ДГТ походить від андростендіона. Основним органом для нейтралізації андрогенів є печінка. Тому в печінці стероїдні гормони піддаються структурним змінам, які, як правило, розглядаються в якості передумов для їх біологічної інактивзації. Деякі метаболіти утворюються і деякі повертаються в обіг до нирки. Таким чином, ліквідація стероїдів з організму здійснюється через сечу.

## **Клінічні тенденції:**

- При синдромі Клайнфельтера рівень ДГТ значно нижче, ніж знайдений у нормальних чоловіків.
- при ідіопатичному гірсутизмі близько 40% пацієнтів мають підвищений рівень ДГТ.
- при полікістозних яєчниках (ЦУП) близько 35% пацієнтів мають підвищений рівень ДГТ.
- Рівень ДГТ у молодих людей набагато вище, ніж у нормальних людей похилого віку, отже, збільшення виробництва андрогену в період статевого дозрівання підвищує маскулінізацію характеристик. Було продемонстровано, що людські насінники виробляють ДГТ, який з'являється в насінних каналцях. Тому в трубчастому пошкодженні виробництво ДГТ погіршується, що призводить до зниження рівня ДГТ плазми (пацієнти з зародковою аплазією клітин і азооспермією).
- рівень ДГТ плазми у хворих анорхією дуже низький.
- Було повідомлено, що при раку передміхурової залози (особливо в стадії D) визначення ДГТ може бути корисним в прогнозуванні відповіді для анти-андрогенної терапії.

## **Процедурні застереження і попередження**

- Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору, надійна продуктивність буде досягнута тільки шляхом суворого і ретельного дотримання інструкції.
- контрольні матеріали або ємності сироватки повинні бути включені в кожному запуску на високому і низькому рівні для оцінки достовірності результатів.
- Коли використання води визначається для розведення або відновлення, використовують дейонізовану або дистильовану воду.
- Для того щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, слід надягати рукавички при поводженні з набором реагентів і людськими зразками.
- Всі реагенти набору і зразки повинні бути доведені до кімнатної температури і обережно, але ретельно перемішані перед використанням. Уникайте повторного заморожування і розморожування реагентів і зразків.

- Калібрувальна крива повинна бути встановлена для кожного запуску.
- Контролі повинні бути включені в кожному прогоні і знаходитися в межах встановлених лімітів довіри.
- Неправомірні процедурні методи, неточне піпетування, неповна промивка, а також неправильне зберігання реагентів може бути зазначено, коли значення аналізу для контролю не відображають встановлені діапазони.
- При читанні мікропланшетів, наявність бульбашок в лунках впливатиме на оптичну густина (ОГ). Обережно видаліть бульбашки перед виконанням кроку читання.
- Розчин субстрату (ТМБ) чутливий до світла і повинен залишатися безбарвним при зберіганні належним чином. Нестабільність або забруднення може бути позначено розвитком блакитного кольору, і в цьому випадку розчин не повинен бути використаний.
- При дозуванні субстрату і стоп-розчину, не використовуйте піпеток, в яких ці рідини прийдуть в контакт з будь-якими металевими частинами.
  - Для запобігання забруднення реагентів, використовуйте новий одноразовий наконечник піпетки для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту і контролю
- Не слід змішувати різні номери лотів компонентів набору в тесті і не використовують будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці
- Набір реагентів слід розглядати як небезпечні відходи і утилізувати відповідно до національного законодавства.

### **ОБМЕЖЕННЯ**

Всі реагенти в наборі відкалібровані для прямого визначення ДГТ в сироватці крові людини. Набір не калібрується для визначення ДГТ в слині, плазмі або інших зразках людини або тварин.

- Не використовуйте сильно гемолізовані, ліпемічні, жовтяничні зразки або сироватку крові, що неправильно зберігалася
- Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тимеросал не сумісні з цим набором, так як вони можуть призвести до помилкових результатів.
- Тільки калібратор А може бути використаний для розведення будь-яких високих зразків сироватки. Використання будь-якого іншого реагенту може привести до помилкових результатів.
- Результати, отримані за допомогою цього набору ніколи не повинні використовуватися в якості єдиної основи для клінічного діагнозу. Наприклад, виникнення гетерофільних антитіл у пацієнтів, які регулярно піддаються впливу тварин або продуктів тваринного походження має потенціал, що викликає перешкоди в імунологічних тестах. Отже, клінічна діагностика повинна включати в себе всі аспекти фону пацієнта, включаючи частоту впливу тварин / продуктів тваринного походження, якщо помилкові результати підозрюються.

### **МИРИ БЕЗПЕКИ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ проти потенційно біологічно небезпечних матеріалів**

Сироватка крові людини, яка могла бути використана при підготовці стандартів і контролів була протестована і виявлено, що не реагує на поверхневий антиген вірусу гепатиту В, а також була протестована на наявність антитіл до HCV і вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) і результати виявилися негативними. Однак жоден метод тестування не може повністю гарантувати, що ВІЛ, гепатит С і вірус гепатиту В або будь-які інфекційні агенти відсутні. Реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку і вони повинні обертатися з тими ж запобіжними заходами стосовно до будь-якого контакту зі зразками крові.

#### **Хімічна небезпека**

Уникайте контакту з реагентами, що містять ТМБ, перекис водню і сірчану кислоту. При контакті з будь-яким з цих реагентів промити великою кількістю води. ТМБ є підозрюваним канцерогеном.

### **ЗРАЗКИ-ЗБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ**

Приблизно 0,2 мл сироватки потрібно для визначення в дублікатах. Відібрати 4-5 мл крові в призначену позначену пробірку і дати згорнутися. Центрифугувати і ретельно видалити шар сироватки. Зберігати при температурі 4 оС до 24 годин або при температурі від -10 ° С або нижче, якщо аналізи повинні бути зроблені в більш пізній термін. Розглядаємо всі зразки крові людини в якості можливих матеріалів і біологічно небезпечних, необхідно вжити відповідних заходів обережності при обертанні.

## ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА ЗРАЗКІВ

Цей аналіз є прямою системою; зразки не вимагають попередньої обробки.

## РЕАГЕНТИ І ОБЛАДНАННЯ, НЕОБХІДНІ, але не надані

- точні мікропіпетки для розподілу 50, 100, 150 і 300 мкл;
- одноразові наконечники
- дистильована або дейонізована вода;
- рідер мікропланшетів з фільтром, встановленим на довжині 450 нм і верхньою межею ОГ 3.0 або більше (див процедуру аналізу крок 10) .

## РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

### AA E-0030 WASH CONC 10 x Концентрат промивного буфера - x10

Містить: 1 бутель з не іонним розчином для промивання і консервантом , що не містить ртуть.

Обсяг: 50 мл / флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8°C

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Спосіб приготування: перед використанням розведіть дистильованою або дейонізованою водою 1:10. Якщо буде використаний весь планшет, то розбавте 50 промивного буфера з 450 мл води.

### AA E-0055 SUBSTRATE ТМБ - субстрат - Готовий до використання

Містить: Один флакон, що містить тетраметилбензидин і перекис водню в буфері, що не містить DMF або DMSO.

Обсяг: 16 мл / флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8°C

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці

### AA E-0080 Stop soln Стоп-розчин. Готовий для використання.

Містить: 1 флакон, що містить 1 М сірчаної кислоти.

Обсяг: 6 мл / флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8°C

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці

## Стандарти і контролю Готові до використання.

Нижче наведені приблизні концентрації, будь ласка, зверніться до етикеток флаконів для точних концентрацій:

Кат. номер	Стандарт	Концентрація	Об'єм
AA E-1701	Стандарт А	0 пг/мл	2,0 мл
AA E-1702	Стандарт В	25 пг/мл	0,6 мл
AA E-1703	Стандарт С	100 пг/мл	0,6 мл
AA E-1704	Стандарт D	500 пг/мл	0,6 мл
AA E-1705	Стандарт Е	1000 пг/мл	0,6 мл
AA E-1706	Стандарт F	2500 пг/мл	0,6 мл
AA E-1751	Контроль 1	Зверніться до етикеток флаконів для очікуваного значення та прийнятного діапазону!	0,6 мл
AA E-1752	Контроль 2		0,6 мл

**Вміст:** ДГТ в білковому буфері з консервантами, що не містять ртуті. Підготовлено за рахунок збільшення буфера з визначеною кількістю ДГТ.

Зберігання: охолодженим при температурі від 2 до 8 °С

Стабільність: 12 місяців у невідкритих флаконах або як зазначено на етикетці. Після відкриття стандарти повинні бути використані протягом 14 днів або аліквотувати, і зберігати замороженими. Уникайте циклів багаторазового заморожування та розморожування.

**AA E-1713 Assay Buff Буфер аналізу** - Готовий до використання

Містить: 1 флакон, що містить основний білковий буферний розчин з консервантом, що не містить ртуті.

Обсяг: 15 мл / флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8°C

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці

**AA E-1731 Розбірний мікропланшет**, покритий кролячими анти-ДГТ антитілами . Готовий до використання.

Містить: Один 96 луночний (12x8) мікропланшет з поліклональних антитіл в зачиненому пакеті з осушувачем.

Зберігання: охолодженим при 2-8°C.

Стабільність: 12 місяців або як вказано на етикетці

**AA E-1740 Концентрований кон'югат ДГТ-HRP - x100 CONJUGATE-CONC x100**

Містить: кон'югат ДГТ-HRP в білковому розчині з консервантом, що не містить ртуть.

Обсяг: 0,2 мл/флакон

Зберігання: охолодженим при 2-8°C

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Спосіб приготування: розвести 1: 100 з буфером для аналізу перед використанням (наприклад, 20 мкл концентрату в 2 мл буфера аналізу). Якщо буде використовуватися весь планшет, то потрібно розвести 120 мкл концентрату в 12 мл буферного розчину для аналізу. Не застосовувати препарат, що залишився.

#### **Процедура аналізу**

Перед використанням все реагенти повинні досягти кімнатної температури. Стандарти, контролі і зразки проб повинні бути досліджені в дублях. Як тільки процедура розпочата, всі кроки повинні бути завершені без перерви.

1. Приготуйте робочі розчини HRP кон'югату і промивного буфера.

2. Видаліть необхідну кількість стріпів. Невикористані стріпи помістіть назад в упаковку, герметично закрийте і помістіть в холодильник.

3. Додайте 50 мкл кожного стандарту, контролю та зразка сироватки в відповідно позначені лунки в дублях.

4. Додайте 100 мкл робочого розчину HRP кон'югату в кожен лунку (рекомендуємо використовувати багатоканальну піпетку)

5. Аккуратно струсіть пластину мікропланшета в шейкері протягом 10 сек. І інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі (без струшування).

6. Промийте кожен лунку по 3 рази: вносячи по 300 мкл розчину для промивання буфера, видаляючи залишки вологи абсорбуючим папером (ми рекомендуємо використовувати вошер) .

7. Додайте 150 мкл ТМБ - субстрату в кожен лунку через задані інтервали часу.

8. Аккуратно струсіть пластину мікропланшета в шейкері протягом 10 сек і інкубуйте 10-15 хвилин при кімнатній температурі не струшуючи (або до того моменту, коли Стандарт А досягне темно-синій колір, досягне бажаної ОГ)

9. Додайте 50 мкл Стоп-розчину в кожен лунку через ті ж інтервали, що і в етапі 7.

10. Зчитати результат на рідері мікропланшетів при 450 нм протягом 20 хвилин після додавання Стоп-розчину. (Якщо оптична густина перевищує верхню межу виявлення або фільтр 450 нм недоступний, то можна замінити на фільтр 405 або 415 нм. Оптичні густини будуть нижче, однак, це не вплине на результати пацієнтів/контрольні зразки.)

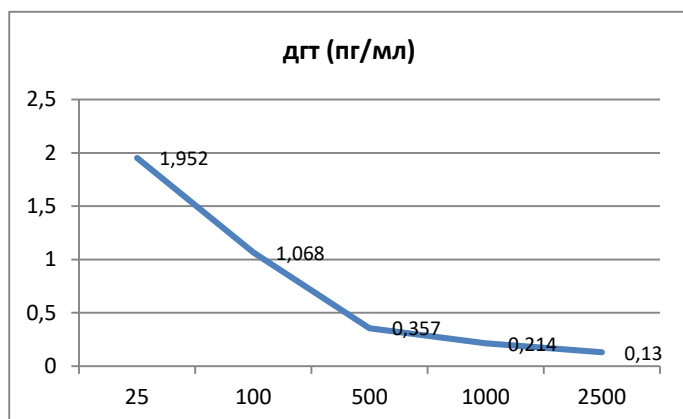
## Розрахунок результатів

1. Розрахуйте середню оптичну густина кожного стандарту в дублікатах.
2. Намалюйте калібрувальну криву на логарифмічному папері із середньою оптичною щільністю на Y-осі і концентрацією калібратора на X-осі. Якщо для аналізу використовується програмне забезпечення, то рекомендується крива на 4-параметра або 5 параметрів.
3. Розрахуйте середню оптичну густина кожного невідомого в дублях.
4. Розрахуйте значення невідомих за допомогою калібрувальної кривої
5. Якщо зразок виходить більше 2500 пг / мл, то розведіть його калібратором А в співвідношенні не більше 1:
8. Отриманий результат слід помножити на коефіцієнт розведення.

Типова таблиця:

Стандарт	ОГ 1	ОГ 2	Середня ОГ	Концентрація (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
Невідомий	0.515	0.507	0.511	300

Типова калібрувальна крива (приклад, не використовуйте для розрахунку)



## ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

### Чутливість

Нижня межа виявлення розраховується за стандартною кривою шляхом визначення результуючої концентрації середнє значення ОГ Стандарту А (на основі 10 повторних аналізів) мінус 2 СД. Тому чутливість прямого набору ІФА для дигідротестостерону становить 6,0 г / мл.

### Специфічність (перехресна реактивність)

Наступні сполуки були протестовані на перехресну реактивність з набором прямого дигідротестостерон ІФА набору з дигідротестостерон перехресною реактивністю на 100%.

Стероїд	% перехресної реактивності
дигідротестостерон	100
тестостерон	8,7
5 & beta; дигідротестостерон	2,0
андростендіон	0,2

Наступні стероїди були протестовані, але перехресно реагували менш 0,01%: дегідроепіандростерон сульфат, 17 & beta; Естрадіол, естріол, естрон, прогестерон, 17-ОН прогестерон, кортизол і прегненолон.

#### Внутріаналітична точність

Три зразка аналізували десять разів кожен по тій же стандартній кривій. Результати (в пг / мл) наведені нижче:

Зразок	середнє	СВ	CV%
1	236,74	26,89	11,4
2	869,03	47,41	5,46
3	1008,14	39,36	3,90

#### Між аналізами точність

Три зразка аналізували десять разів протягом чотирьох тижнів. Результати (в пг / Мл) наведені нижче:

Зразок	середнє	СВ	CV%
1	280,88	34,07	12,1
2	721,40	54,20	7,5
3	1025,41	60,45	5,9

#### Відновлення

Збагачені зразки готували шляхом додавання визначених кількостей ДГТ до трьох зразків сироватки пацієнта. Результати (в пг / мл) наведено нижче:

Зразок	Результат, що спостерігається	Очікуваний результат	Відновлення %
1 незбагачений	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 незбагачений	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 незбагачений	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

## ЛІНІЙНІСТЬ

Три зразки сироватки пацієнтів розбавляли стандартом А. Результати (в пг / мл) наведені нижче:

Зразок	Результат, що спостерігається	Очікуваний результат	Відновлення %
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

## ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Прямий набір для дигідротестостерону (набір А) порівнювали з набором RIA (набір В), що покривається конкурентами. Результати (в пг / мл) наведено нижче:

група	Кількість	Набір А с значення	Набір В значення
жінки	10	95,5	99,0
чоловіки	10	280,0	252,0

## Очікувані нормальні значення

Що стосується всіх клінічних аналізів, кожна лабораторія повинна збирати дані та встановлювати власний діапазон очікуваних нормальних значень.

Група	Діапазон (пг/мл)
Чоловіки	250-990
Пременопауза (жінки)	24-368
Постменопауза (жінки)	10-181



## ЛІТЕРАТУРА

- 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 $\beta$ 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.

## Умовні позначення:

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо для <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	<b>LOT</b> Код партії	<b>IVD</b> Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
 Звертайтеся до інструкції по експлуатації	<b>CONT</b> зміст	<b>CE</b> Маркування
 Обережно	<b>REF</b> Каталожний номер	