



## НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИГИДРОТЕСТОСТЕРОНА МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения  
дигидротестостерона в сыворотке крови человека

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

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 25-10-2010  
Версия 4.0

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 $\alpha$ -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 семявыводящих 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 растворов.
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 аккуратно, 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, полученные 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 вид 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 ТМВ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМВ 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 микроплшета 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 мультисканальной

пипетки).

- Инкубировать в течение 60 минут (приблизительная скорость 200 об/мин) при комнатной температуре на шейкере.
- 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).
- Пипетировать 150 мкл Субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковой скоростью.
- Инкубировать на шейкере в течении 10-15 минут при комнатной температуре (или до тех пор, пока калибратор А не достигнет темно-синего окраса для необходимой ОП).
- Пипетировать 50 мкл стоп раствора в каждую лунку с одинаковой скоростью как в шаге 7.
- 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

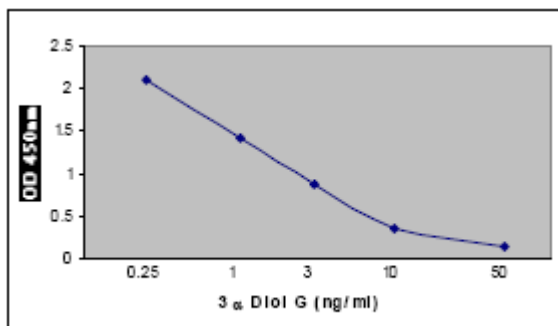
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
- Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности калибраторов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
- Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
- 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	361.51	88.6
	+235.06	501.66	95.4
	+470.13	744.81	97.9
2	324.75	-	-
	+117.53	389.43	88.0
	+235.06	505.23	90.3
	+470.13	712.44	89.6
3	720.11	-	-
	+117.53	758.13	90.5
	+235.06	856.46	89.7
	+470.13	1013.61	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	165.35	97.1
	1:4	95.39	112.0
	1:8	48.47	113.8
2	1086.01	-	-
	1:2	508.58	93.7
	1:4	232.11	85.5
	1:8	114.95	84.7
3	1313.21	-	-
	1:2	612.98	93.4
	1:4	318.63	97.1
	1:8	134.98	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

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «БиоТехЛаб-С»  
ул. Чорновола, 97,  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел./факс: (0342) 52-57-10  
80681043216 (безлимит)  
E-mail: [info@biotechlab-s.com](mailto:info@biotechlab-s.com)  
[www.biotechlab-s.com](http://www.biotechlab-s.com)