

НАБІР ІФА
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
ДИГІДРОТЕСТОСТЕРОНУ
В СИРОВАТЦІ ЛЮДИНИ

2042-6, Dihydro-Testosterone

Каталог. №: 2042-6

Методика від 06-18-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	Dihydro-Testosterone ELISA
Метод	Імуносорбентний аналіз з ферментною міткою
Принцип	Конкурентний кон'югований пероксидазою ІФА
Діапазон визначення	0-2500 пг/мл
Зразок	50 мкл сироватки
Специфічність	100 %
Чутливість	6 пг/мл
Загальний час	~ 75 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців від дати виробництва

* Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийняті до уваги.

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

DAI Дигідротестостерон ІФА призначений для прямого кількісного визначення Дигідротестостерону за допомогою імуноферментного аналізу в сироватці людини. Тільки для діагностики In Vitro.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Принцип наступного імуноферментного аналізу заснований на типовому сценарії конкурентного зв'язування. Конкуренція відбувається між неміченим антигеном (присутній в стандартах, контролях і зразках пацієнтів) і ферментно-міченим антигеном (кон'югатом) за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл на мікролунковому планшеті. Промиванням та декантуванням видаляється незв'язаний матеріал. Після стадії промивки додається ферментний субстрат. Ферментативна реакція зупиняється додаванням стоп-розчину. Оптична щільність вимірюється на мікротитраційному зчитувачі. Інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації ДНТ у зразку. Набір стандартів використовується для побудови калібрувальної кривої, з якої кількість ДНТ в зразках пацієнта і контролях може бути безпосередньо визначена.

ПРОЦЕДУРНІ ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання набору. Надійна робота буде досягнута тільки шляхом суворого і ретельного дотримання інструкції.
- Контрольні матеріалами або сироваткові пули повинні бути включені в кожен аналіз з високим та низьким рівнем для оцінки достовірності результатів.
- При використанні води для розведення або відновлення, використовувати деіонізовану або дистильовану воду.
- Для того, щоб знизити вплив потенційно шкідливих речовин, слід надягати рукавички при роботі з реагентами і людськими зразками.
- Всі реагенти повинні бути доведені до кімнатної температури і обережно та ретельно перемішані перед використанням. Уникати повторного заморожування і відтавання реагентів і зразків.
- Калібрувальна крива повинна бути побудована для кожного запуску.
- Контролі повинні бути включені в кожний запуск і знаходитись у встановлених межах.
- Некоректні процедурні методи, неточне піпетування, неповне промивання, а також неправильне зберігання реагенту можуть призвести до того, що контролю не попадуть у встановлені межі.

- При зчитуванні мікропланшету наявність бульбашок в лунках буде впливати на оптичну щільність (OD). Обережно видаліть бульбашки перед виконанням зчитування.
- Розчин субстрату (ТМВ) чутливий до світла і повинен залишатися безбарвним при правильному зберіганні. Розвиток синього кольору може вказувати на нестабільність або забруднення, в цьому випадку він не повинен використовуватись.
- При внесенні субстрату і стоп-розчину не слід використовувати піпетки, в яких ці рідини можуть контактувати з металевими частинами.
- Для запобігання забруднення реагентів, використовувати нові одноразові наконечники для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту і контролю.
- Не змішувати компоненти набору з різних партій і не використовувати будь-який компонент після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Реагенти необхідно розглядати як небезпечні відходи та утилізувати відповідно до національних правил.

ОБМЕЖЕННЯ

- Усі реагенти в наборі відкалібровані для прямого визначення ДГТ в сироватці крові людини. Набір не калібрований для визначення ДГТ в сліні, плазмі або інших зразках людського або тваринного походження.
- Не використовуйте сильно гемолізовані, ліпемічні, жовтяничні або неправильно збережені сироватки.
- Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тімерсал, не сумісні з цим набором, так як вони можуть призвести до помилкових результатів.
- Тільки калібратор А може бути використаний для розведення будь-якого високого зразка сироватки. Використання будь-якого іншого реагенту може призводити до помилкових результатів.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ. ПОТЕНЦІЙНО БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ

Сироватки людини, які можуть бути використані при приготуванні стандартів і контролей, були випробувані і визнані негативними до поверхневого антигену гепатиту В, а також були перевірені на присутність антитіл до ВГС і Вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ), та виявились негативними. Проте жоден тест не може дати повної гарантії, що ВІЛ, ВГС і вірус гепатиту В або будь-які інфекційні агенти відсутні. Реагенти повинні розглядатися як потенційно біологічна небезпека та оброблятися з тими ж заходами безпеки, які застосовуються до будь-якого зразка крові.

ХІМІЧНА НЕБЕЗПЕКА

Уникати контакту з реагентами ТМВ, перекисом водню і сірчаною кислотою. При контакті з будь-яким з цих реагентів, промийте великою кількістю води. ТМВ є потенційним канцерогеном.

ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Приблизно 0.2 мл сироватки потрібно для аналізу в дублях. Зібрати 4-5 мл крові у відповідно марковану пробірку і дати згорнутися. Центрифугувати і обережно видалити шар сироватки. Зберігати при температурі 4 °C протягом 24 годин або при -10 °C або нижче, якщо аналіз запланований на більш пізню дату. Вважати всі зразки людського походження можливими біологічно небезпечними речовинами та вжити відповідних заходів обережності при роботі з ними.

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Цей аналіз є прямим аналізом; попередньої обробки зразків не потрібно.

РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

- Прецизійні піпетки на 50, 100, 150 і 300 мкл
- Одноразові наконечники
- Дистильована або деіонізована вода
- Шейкер
- Мікропланшетний зчитувач з фільтром на 450 нм і верхньою межею ОЩ 3.0 або вище* (див. Процедура аналізу крок 10).

РЕАГЕНТИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ

- Мікропланшет, вкритий кролячими антитілами анти-ДНТ** - готовий до використання.
Містить: один 96-лунковий (12x8) планшет, покритий поліклональними антитілами в пакеті з осушувачем.
Зберігання: при 2- 8 °C
Стабільність: 12 місяців або відповідно до вказівок на етикетці.
- Концентрат Кон'югату Дигідротестостерон-пероксидаза хрому (HRP)** - вимагає підготовки.
Вміст: Кон'югат ДНТ-HRP в білковому буфері з не ртутним консервантом.
Об'єм: 200 мкл/флакон

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців або відповідно до вказівок на етикетці.

Приготування: розвести 1:100 в буфері для аналізу перед використанням (наприклад, 20 мкл HRP в 2 мл аналітичного буфера). Якщо вся пластина повинна бути використана, розвести 120 мкл HRP в 12 мл буфера. Викинути будь-які залишки.

3. **Калібратори Дигідротестостерону - готові до використання.**
Вміст: шість флаконів, що містять DHT в білковому буфері з не ртутним консервантом. Підготовлені насиченням буфера з визначеними кількостями DHT. *Нижче наведені приблизні концентрації; будь ласка, зверніться до етикеток на флаконах щодо точних концентрацій.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator A	0 pg/ml	2.0 ml
Calibrator B	25 pg/ml	0.6 ml
Calibrator C	100 pg/ml	0.6 ml
Calibrator D	500 pg/ml	0.6 ml
Calibrator E	1000 pg/ml	0.6 ml
Calibrator F	2500 pg/ml	0.6 ml

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців в закритих флаконах або відповідно до вказівок на етикетці. Після відкриття стандарти повинні бути використані протягом 14 днів або на поділені для зберігання у замороженому вигляді. Уникати повторного заморожування і відтавання.

4. **Контроль - готовий до використання.**

Вміст: Два флакона, що містять DHT в білковому буфері з не ртутним консервантом. Підготовлені насиченням буфера з визначеними кількостями DHT. Зверніться до етикеток на флаконах для очікуваного значення і допустимого діапазону.

Об'єм: 0.6 мл/флакон

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців в закритій ампулі або, як зазначено на етикетці. Після відкриття Контроль повинен бути використаний протягом 14 днів або на поділений для зберігання у замороженому вигляді. Уникати повторного заморожування і відтавання.

5. **Концентрат промивного буфера - вимагає підготовки.**

Вміст: один флакон, що містить буфер з неіонних миючих засобів і не містить ртутний консервант.

Об'єм: 50 мл/пляшка

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців або відповідно до вказівок на етикетці.

Приготування: розвести 1:10 в дистильованій або деіонізованій воді перед використанням. Якщо вся пластина повинна бути використана, розвести 50 мл концентрату Буфера розчину для промивання в 450 мл води.

6. **Робочий Буфер - готовий до використання.**

Вміст: один флакон, що містить білковий буфер з не ртутним консервантом.

Об'єм: 15 мл/флакон

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців або відповідно до вказівок на етикетці.

7. **Субстрат ТМБ - готовий до використання.**

Вміст: один флакон, що містить Тетраметилбензидин і перекис водню в не-DMF або DMSO, які містять буфер.

Об'єм: 16 мл/пляшка

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців або відповідно до вказівок на етикетці.

8. **Стоп - розчин - готовий до використання.**

Вміст: один флакон, що містить 1 М сірчаної кислоти.

Об'єм: 6 мл/флакон

Зберігання: при 2- 8 °С

Стабільність: 12 місяців або відповідно до вказівок на етикетці.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

Попередня обробка зразка: Не потребує.

Всі реагенти необхідно довести до кімнатної температури перед використанням. Калібратори, контролю і зразки слід аналізувати у двох примірниках. Після того, як процедура була запущена, всі кроки повинні бути завершені без перерв.

1. Підготувати робочі розчини кон'югату DHT-HRP та промивного буфера.
2. Приготувати необхідну кількість смужок. Смужки, які не використовуються, повернути в холодильник.
3. Піпетувати 50 мкл кожного калібратора, контролю та зразка в відповідно позначені лунки у двох примірниках.
4. Внести 100 мкл робочого розчину Кон'югату в кожну лунку (рекомендується використовувати багатоканальну піпетку).
5. Інкубувати в планшетному шейкері (близько 200 об/хв.) протягом 1 години при кімнатній температурі.
6. Промити лунки 3 рази 300 мкл розведеного промивального буфера на лунку і промокнути фільтрувальним папером, щоб

переконатися, що вони сухі (рекомендується використання вошера).

7. Внести 150 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку з однаковими часовими інтервалами.
8. Інкубувати на шейкері протягом 10-15 хвилин при кімнатній температурі (або поки калібратор не досягне темно-синього кольору для бажаної ОЩ).
9. Піпетувати 50 мкл стоп-розчину в кожну лунку з однаковими часовими інтервалами як в кроці 7.
10. Зчитати результати при 450 нм протягом 20 хвилин після додавання стоп-розчину.

* Якщо ОЩ перевищує верхню межу виявлення або якщо фільтр з довжиною хвилі 450 нм недоступний, можна використовувати фільтр з довжиною хвилі 405 або 415 нм. Оптичні щільності будуть нижче, проте, це не вплине на результати аналізу зразків пацієнта/контрольних зразків.

РОЗРАХУНКИ

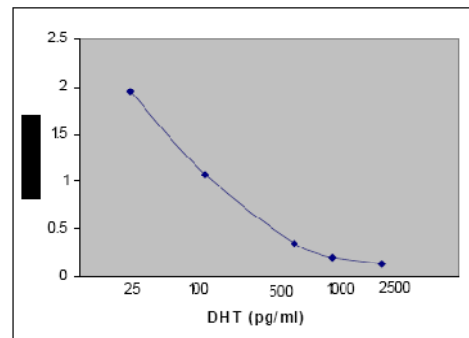
1. Розрахувати середню оптичну щільність кожного калібратора в дублях.
2. Намалювати калібрувальну криву на напівлогарифмічному папері з середніми оптичними щільностями на Y-осі і концентраціями калібраторів на осі абсцис. Якщо використовується програмне забезпечення, 4-параметрична крива рекомендується.
3. Розрахувати середню оптичну щільність кожного невідомого дублікату.
4. Прочитати значення невідомих прямо з калібрувальної кривої.
5. Якщо зразок дає значення більше 2500 пг/мл, необхідно розвести його калібратором А не більше 1:8. Отриманий результат слід помножити на коефіцієнт розведення.

ТИПОВІ ДАНІ

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (pg/ml)
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
Unknown	0.615	0.507	0.511	300

ТИПОВА КРИВА КАЛІБРУВАННЯ

Тільки для прикладу. Не використовувати для розрахунку результатів.



РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чутливість

Нижня межа виявлення розраховується за калібрувальною кривою шляхом визначення кінцевої концентрації середньої ОЩ калібратора (по 10 повторних аналізах) мінус 2 SD. Таким чином, чутливість даного набору складає 6.0 пг/мл.

Специфічність (перехресна реактивність)

Наступні сполуки були перевірені на перехресну реактивність з даним набором з дигідротестостероном, перехресно реагуючим при 100%.

Стероїд	% Перехресна реактивність
Дигідротестостерон	100
Тестостерон	8.7
5β Дигідротестостерон	2.0
Андростенедіон	0.2

Наступні стероїди були протестовані, але перехресно реагували при значеннях, менших 0,01%: дигідроепіандростерон сульфату, 17β-естрадіол, Естріол, естрон, Прогестерон, 17-ОН Прогестерон, Кортизол і прегненолон.

Точність в аналізі

Три зразки були протестовані десять разів кожен на тій же калібрувальній кривій. Результати (у пг/мл) наведено нижче:

Взірець	Середнє	SD	CV%
1	236.74	26.89	11.4
2	869.03	47.41	5.46
3	1008.14	39.36	3.90

Точність між аналізами

Три зразки були протестовані десять разів кожен на протязі 4 тижнів. Результати (у пг/мл) наведено нижче:

Взірець	Середнє	SD	CV%
1	280.88	34.07	12.1
2	721.40	54.20	7.5
3	1025.41	60.45	5.9

Відновлення

Насичені зразки готували шляхом додавання визначеної кількості DHT в три зразки сироватки. Результати (в пг/мл) наведено нижче:

Взірець	Отриманий результат	Очікуваний результат	Відновлення %
1 Ненасичений	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 Ненасичений	324.75	-	-
+117.53	389.43	442.29	88.0
+235.06	505.23	559.81	95.4
+470.13	712.44	794.88	97.9
3 Ненасичений	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 розводили калібратором А. Результати (в пг/мл) наведено нижче:

Взірець	Отриманий результат	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

Набір Дигідротестостерон ELISA (набір А) порівнювали з конкурентним набором RIA (набір В). Результати (в пг/мл) наведено нижче:

Група	N	Середнє Набору А	Середнє Набору В
Жінки	10	95.5	99.0
Чоловіки	10	280.0	252.0

Очікувані Нормальні значення

Як і для всіх клінічних аналізів, кожна лабораторія повинна встановити свій діапазон нормальних значень.

Група	Діапазон (пг/мл)
Жінки:	
перед клімактеричні	24-368
пост клімактеричні	10-181
Чоловіки	250-990



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com