



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 5α-АНДРОСТАН-3α, 17β-ДИОЛ ГЛЮКУРОНИДА МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения 5α-андростан-3α,
17β-диол глюкуронида в сыворотке крови человека

Кат.№ CAN-DG-460
Производитель: Diagnostics Biochem Canada Inc., (Канада)

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

Методика от 25-10-2010
Версия 5.0

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения 5α-андростан-3α, 17β-диол глюкуронида в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа. Только для использования в исследовательских целях. Не для использования в диагностике.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на иммуноферментном анализе с использованием конкурентного связывания. Немеченый антиген (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 3α Diol G в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация 3α Diol G в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

5α-андростан-3α, 17β-диол глюкуронид – это C19 стероид, для его обозначения используется аббревиатура 3α-диол G, 5α-диол G или, просто, α-диол G. Он продуцируется в основном как метаболит тестостерона и дигидротестостерона (DHT). Он в больших количествах продуцируется в периферических тканях, таких, как кожа, особенно вокруг волосяных фолликулов. Стимуляция большими количествами 3α-диол G приводит к избыточному формированию волос, особенно там, где в норме у женщин волосы не присутствуют.

В последние годы интерес к определению этого стероида очень вырос, особенно среди исследователей, изучающих случаи идиопатического гирсутизма у женщин. Среди стероидов, известных как предшественники 3α-диол-G, можно перечислить дегидроэпиандростерон (DHEA), дегидроэпиандростерон сульфат (DHEAS), дигидротестостерон (DHT), андростендион и тестостерон. Только для 3α-диол G было показано повышение при гирсутизме и снижение при лечении. Эта корреляция также была показана у пациенток при синдроме поликистозных яичников (PCO). Доказано, что определение 3α-диол G может быть полезным маркером при различных состояниях, включая мониторинг эффективности лечения идиопатического гирсутизма и мониторинг женщин, страдающих PCO. Кроме того, у пациентов, больных диабетом (и мужчин, и женщин), получающих терапию циклоспорином А, было показано повышение уровня 3α-диол G при побочном эффекте, приводящем к появлению волос в областях, где ранее волос не было.

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.

- Контрольные материалы или пулы сывороток с высоким и низким значениями должны быть включены в каждую постановку для оценки достоверности результатов.
- Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
- Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо надевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
- Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
- Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
- Контроли должны быть включены в каждую постановку. Их значения, полученные при тестировании, должны соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
- 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.
- 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.
- 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.
- Буфер для анализов чувствителен к свету и должен храниться в оригинальной темной бутылочке и не подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.
- При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
- Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
- Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения 3α-диол G в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения 3α-диол G в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
- Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
- Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
- Для разведения сывороток с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
- 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 к 3α Diol G (с «кломаемыми» 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 3α Diol G-пероксидаза хрена (HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат 3α Diol G-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 300 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 1:50 в рабочем буфере (например, 40 мкл HRP в 2 мл буфера для анализов). При использовании всего микроплшета разведите 240 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Калибраторы 3α Diol G - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих 3α Diol G в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением известных количеств 3α Diol G в матрикс.

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

Калибратор	Концентрация (нг/мл)	Объем/флакон (мл)
Калибратор А	0	2.0
Калибратор В	0.25	0.6
Калибратор С	1	0.6
Калибратор D	3	0.6
Калибратор E	10	0.6
Калибратор F	50	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 аликутированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

4. Контроли – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие 3α Diol G в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен с добавлением определенного количества 3α Diol G 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 аликутированы 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.

*Перед использованием подогреть для полного растворения.

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 3α Diol G 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).
5. Инкубировать в течение 30 минут (приблизительная скорость 200 об/мин) при комнатной температуре на шейкере.
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).

- 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

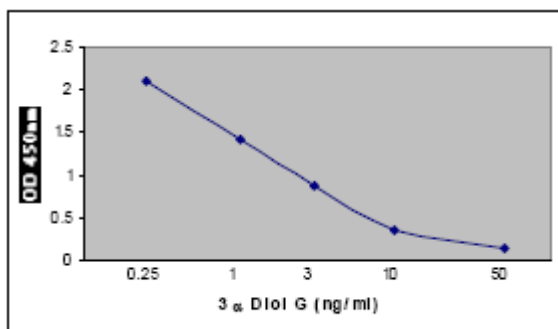
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
- Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности калибраторов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование 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 50 нг/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 (нг/мл)
A	2.480	2.474	2.477	0
B	2.102	2.106	2.104	0.25
C	1.428	1.413	1.421	1
D	0.877	0.883	0.880	3
E	0.360	0.368	0.364	10
F	0.147	0.143	0.145	50
неизвестный	0.598	0.596	0.597	5.4

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 3α Diol G ELISA составила 0.1 нг/мл.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы на перекрестную реактивность с помощью данного метода, при 100% перекрестной реактивности для 3α Diol G:

Стероид	Перекрестная реактивность, %
3α Diol G	100
Тестостерон	0.2
Прогестерон	0.16
Андростендион	0.14
кортизол	0.05

Кроме того, следующие перечисленные соединения были протестированы и перекрестная реактивность составила менее 0.01%: кортикостерон, дегидроэпиандростерон, дигидротестостерон, эпиандростерон, 17β-эстрадиол и эстрон.

Точность внутри серии:

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

Образец	Среднее	SD	CV%
1	0.87	0.07	7.8
2	6.86	0.49	7.2
3	21.26	1.29	6.0

Точность между сериями:

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

Образец	Среднее	SD	CV%
1	0.98	0.10	10.4
2	7.05	0.46	6.5
3	20.92	2.26	10.8

Воспроизводимость

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств 3α Diol G к трем образцам сывороток пациентов. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1 не обогащенный	0.67	-	-
	+0.5	1.17	91.4
	+5.0	4.99	88.0
	+15.0	12.66	80.8
2 не обогащенный	1.83	-	-
	+0.5	2.33	88.8
	+5.0	6.83	90.5
	+15.0	17.64	104.8
3 не обогащенный	12.76	-	-
	+0.5	13.26	115.5
	+5.0	17.76	108.2
	+15.0	22.68	81.7

Линейность

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

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1	6.24	-	-
	1:2	3.12	90.7
	1:4	1.56	99.4
	1:8	0.78	94.9
2	13.55	-	-
	1:2	6.77	88.6
	1:4	3.39	80.0
	1:8	1.64	103.6
3	17.05	-	-
	1:2	8.53	81.2
	1:4	4.26	96.0
	1:8	2.13	109.8

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

Группа	Интервал (нг/мл)
Мужчины	1.53-14.82
предклимактерический	0.22-4.64
послеклимактерический	0.61-3.71
пубертатный период (женщины)	0.51-4.03

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

www.biotechlab-s.com