



Androstendion

(cz) český



Obsah

- K00197**
- 1 mikrotitrační destička: 96 jamek (12x 8-jamkových protilátkou potažených proužků, jednotlivě zlomitelných)
 - 6 x 1 mL Kalibrátory
 - 1 x 1 mL Kontrola
 - 1x 21 mL enzymový konjugát
 - 1x 15 mL roztok substrátu
 - 1x 15 mL zastavovací roztok
 - 1x 50 mL promývací roztok (10x konc.)
 - 1 příbalový leták
 - 1 certifikát analýzy.

Pouze pro profesionální in vitro diagnostické použití!

ÚČEL POUŽITÍ

ELISA pro kvantitativní stanovení androstendionu v lidském séru nebo plazmě.
Tento kit je určen pouze pro in vitro diagnostické použití.

DIAGNOSTICKÉ VÝZNAM

Androstendion (také známý jako $\Delta 4$ -androstendion) je steroidní hormon produkovaný v nadledvinách a gonádách jako meziprodukt v biochemické dráze produkující androgen testosteron a estrogeny estron a estradiol. Je to společný prekurzor mužských a ženských pohlavních hormonů. Část androstendionu je také vylučována do plazmy a může být v periferních tkáních proměněn na testosteron a estrogény.

Androstendion má relativně slabou androgenní aktivitu odhadovanou na ~20% testosteronu. Nicméně sérové hladiny androstendionu často převyšují testosteron jak v normálních tak i chorobných stavech. Rychlost produkce a sekrece také převyšují ty testosteronu u žen, u kterých dochází ke značné extra-adrenální proměně androstendionu na testosteron.

U žen před menopauzou nadledviny a vaječníky obě produkují přibližně polovinu celkového androstendionu (přibližně 3 mg/den).

Po menopauze se produkce androstendionu snižuje na polovinu, hlavně kvůli snížení steroidů vylučovaných vaječníky. Androstendion je nicméně hlavním steroidem produkovaným postmenopauzálním vaječníkem.

Měření sérového androstendionu poskytuje užitečný marker biosyntézy androgenů. Zvýšené hladiny androstendionu byly prokázány u virilizující kongenitální adrenální hyperplazie. Hladiny sérového androstendionu jsou také zvýšeny u syndromu polycystických ovárií a v případě hirsutismu u žen. Zvýšené sérové hladiny androstendionu se mohou také vyskytovat u virilizujících nádorů nadledvin a vaječníků.

PRINCIP TESTU

Androstendion (antigen) ve vzorku soutěží s antigenním androstendionem konjugovaným s křenovou peroxidázou (HRP) o vazbu na omezený počet protilátek proti androstendionu nanesených na mikrotitrační destičku (pevná fáze).

Po inkubaci se vykoná separace navázaných/volných molekul jednoduše promytím pevné fáze.

Potom enzym HRP v navázané frakci reaguje se substrátem (H_2O_2) a TMB substrátem za vzniku modré barvy, která se změní na žlutou po přidání zastavovacího roztoku.

Intenzita barvy je nepřímo úměrná koncentraci androstendionu ve vzorku.

Koncentrace androstendionu ve vzorku se vypočítá z kalibrační křivky.

SLOŽENÍ REAGENCIE

Složky	Popis													
Mikrotitrační destička	Protilátky proti androstendionu absorbované na mikrotitrační destičku													
Kalibrátory	Kalibrátory mají následující koncentraci androstendionu <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>C_0</td> <td>C_1</td> <td>C_2</td> <td>C_3</td> <td>C_4</td> <td>C_5</td> </tr> <tr> <td>ng/mL</td> <td>0</td> <td>0.1</td> <td>0.4</td> <td>1.2</td> <td>4.0</td> <td>10.0</td> </tr> </table>	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	ng/mL	0	0.1	0.4	1.2	4.0	10.0
C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5									
ng/mL	0	0.1	0.4	1.2	4.0	10.0								
Kontrola	Koncentrace androstendionu v kontrole je specifická pro šarži a je uvedena na označení vialky													
Enzymový konjugát	Androstendion konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP)													
Roztok substrátu	H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)													



Zastavovací roztok	Kyselina sírová 0.15 mol/L (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)
Promývací roztok (10x konc.)	0.2 M fosfátový pufr, pH 7.4

POTŘEBNÉ, ALE NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Destilovaná voda
- Automatický dávkovač
- Reader mikrotitračních destiček (450 nm, 620-630 nm)

PŘÍPRAVA REAGENCIE

Příprava kalibrátorů (C₀-C₅)

Před použitím nechte kalibrátory na rotátoru na alespoň 5 minut.

Kalibrátory jsou připraveny k použití a mají koncentrace androstendionu:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.1	0.4	1.2	4.0	10.0

Stabilita: do data expirace vytisknutého na označení.

Po otevření jsou kalibrátory stabilní po dobu šesti měsíců při 2-8 °C.

Příprava promývacího roztoku

Před použitím zředte obsah každé vialky pufrovaného promývacího roztoku (10x) destilovanou vodou na konečný objem 500 mL. Pro menší objemy dodržujte poměr ředění 1:10. zředěný promývací roztok je stabilní 30 dnů při 2-8 °C. v koncentrovaném promývacím roztoku je možné zpozorovat přítomnost krystalů; v tomto případě míchejte při pokojové teplotě do kompletního rozpuštění krystalů. Pro větší přesnost zředte celou láhev koncentrovaného promývacího roztoku do 500 mL, dbejte o úplný přenos krystalů a potom míchejte do kompletního rozpuštění krystalů.

STABILITA A SKLADOVÁNÍ

Všechny reagenty skladujte při 2-8 °C ve tmě.

Sáček s mikrotitrační destičkou otevřete, až když je při pokojové teplotě a okamžitě po použití jej zavřete; po otevření je stabilní do data expirace kitu.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Používejte vhodné osobní ochranné vybavení během práce s poskytovanými reagenty.
- Dodržujte správnou laboratorní praxi (GLP) pro manipulaci s krevními produkty.
- Některé reagenty obsahují jako konzervovadlo malé množství Proclin 300®. Zabraňte styku s pokožkou nebo sliznicemi.
- TMB substrát obsahuje dráždivou látku, která může být škodlivá po vdechnutí, požití nebo absorpci přes pokožku. Pro zamezení zranění zabraňte vdechnutí, požití nebo styku s pokožkou a očima.
- Zastavovací roztok pozůstává ze zředěného roztoku kyseliny sírové. Kyselina sírová je jedovatá a žíravá a může být toxická po požití. Pro předcházení chemickým popáleninám zabraňte styku s pokožkou a očima.
- Zabraňte vystavení reagenty TMB/H₂O₂ přímému slunečnímu světlu, kovům nebo oxidantům. Roztok nezamrazujte.
- Dodržujte prosím striktně sekvenci pipetovacích kroků uvedenou v tomto protokolu. Zde uvedené údaje činnosti byly získány s použitím specifických reagentů a uvedených v tomto návodu k použití.
- Všechny reagenty mají být skladovány v lednici při 2-8°C v původních nádobách. Jakékoli výjimky jsou jasně označeny. Reagenty jsou stabilní do data expirace, pokud jsou skladovány a manipulují se s nimi podle popisu.
- Všechny součásti kitu a vzorky nechte před použitím dosáhnout pokojovou teplotu (22-28°C) a důkladně promíchejte.
- Nevyměňujte součásti kitu z různých šarží. Je třeba dodržovat datum expirace uvedený na krabici a označení vialek. Nepoužívejte žádné součásti kitu po jejich datu expirace.
- Pokud používáte automatizované zařízení, přebírá uživatel odpovědnost pro zajištění, že kit byl adekvátně otestován.
- Neúplné nebo nepřesné odstranění kapaliny z jamek může ovlivnit preciznost metody a/nebo zvýšit pozadí. Pro zlepšení činnosti kitu na automatizovaných systémech se doporučuje zvýšit počet promytí.
- Je důležité aby byla doba reakce v každé jamce konstantní kvůli opakovatelnosti výsledků. Pipetování vzorků nesmí trvat déle jako 10 minut, aby se zamezilo posunu při analýze. Pokud je potřebných víc jako 10 minut, dodržujte stejné pořadí dávkování. Pokud se používá více jako jedna destička, doporučuje se zopakovat kalibrační křivku v každé destičce.
- Přidání roztoku substrátu spouští kinetikou reakci, která je zastavena přidáním zastavovacího roztoku. Proto je třeba roztok substrátu a zastavovací roztok přidávat ve stejném pořadí, aby se odstranila časová odchylka v průběhu reakce.
- Dodržujte postupy pro vykonávání kontroly kvality ve zdravotnických laboratořích měření kontrol a/nebo spojených sér.
- Maximální preciznost je potřebná při přípravě a dávkování reagentů.

- V této metodě se nemají používat mikrobiologicky kontaminované, vysoce lipemické nebo hemolytické vzorky.
- Readery mikrotitračních destiček měří svisle. Nedotýkejte se dna jamek.

ODBĚR A SKLADOVÁNÍ VZORKU

Příprava vzorku

Stanovení androstendionu je možné vykonat tak v plazmě jako i v séru. Vzorky skladujte při -20 °C, pokud se stanovení nemá vykonat v den odběru vzorku. Vyhněte se opakovaným cyklům rozmrazení a zmrazení vzorků. Vzorky s hodnotou vyšší jako 10 ng/mL zřed'te kalibrátorem 0 (v poměru 1:2).

Kontrola je určena k přímému použití.

POSTUP TESTU

- Reagencie a vzorky přiveďte na pokojovou teplotu (18-25 °C) na alespoň 30 minut. Na konci analýzy uložte reagencie okamžitě na 2-8°C: vyhněte se dlouhodobému vystavení pokojové teplotě.
- Nepoužité potažené mikrotitrační proužky je třeba nechat bezpečně ve fóliovém sáčku s desikantem a skladovat při 2-8 °C.
- Pro zabránění potencionální mikrobiální nebo chemické kontaminace se nikdy nesmí nepoužité reagencie vracet do původních vialek.
- Protože je nutné vykonávat stanovení v duplikátech kvůli zlepšení přesnosti výsledků testu, připravte pro každý bod kalibrační křivky (C₀-C₅) dvě jamky, dvě pro každou kontrolu, dvě pro každý vzorek, jednu pro blank.

1. Pipetujte

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Vzorek/Kontrola	---	25 µL	---
Kalibrátory C ₀ -C ₅	25 µL	---	---
Enzymový konjugát	200 µL	200 µL	---

2. Inkubujte při +37 °C po dobu 1 hodiny.

3. Odstraňte obsah každé jamky. Promyjte jamky 3 krát 300 µL zředěného promývacího roztoku.

Důležitá poznámka: v průběhu každého promývacího kroku jemně třeste destičkou 5 sekund a odstraňte přebytečný roztok oklepáním obrácené destičky na absorpční papírový ubrousek.

Automatická promývačka: pokud používáte automatizované vybavení, promyjte jamky alespoň 5 krát.

4. Pipetujte

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Roztok substrátu	100 µL	100 µL	100 µL

5. Inkubujte při pokojové teplotě (22-28 °C) 15 minut ve tmě.

6. Pipetujte

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Zastavovací roztok	100 µL	100 µL	100 µL

7. Jemně zatřeste mikrotitrační destičkou.

Změřte absorbanci (E) při 450 nm proti referenční vlnové délce 620-630 nm nebo proti blanku v průběhu 5 minut.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Průměrná absorbance

Vypočtete průměr absorbance (E_m) pro každý bod kalibrační křivky (C₀-C₅) a pro každý vzorek.

Kalibrační křivka

Vyneste průměrnou hodnotu absorbance (E_m) kalibrátorů (C₀-C₅) proti koncentraci. Přeložte nejlépe odpovídající křivku vyneseny body. (např. 4 parametrová logistická).

Výpočet výsledků

Interpolujte hodnoty vzorků na kalibrační křivce pro získání příslušných hodnot koncentrací vyjádřených v ng/mL.

KONTROLA KVALITY A KALIBRACE

Každá laboratoř by měla měřit kontroly s normálními, vysokými a nízkými rozsahy hladin androstendionu pro sledování činnosti analýzy. S těmito kontrolami je třeba zacházet jako s neznámými a jejich hodnoty určit v každém vykonaném testovacím postupu. Je třeba udržovat tabulky kvality kontroly pro sledování činnosti dodávaných reagensů. Je třeba použít vhodné statistické metody pro zjištění trendů. Jednotlivá laboratoř musí nastavit přijatelné limity činnosti analýzy. Jiné parametry, které je třeba sledovat, jsou 80, 50 a 20% průsečíky kalibrační křivky pro opakovatelnost mezi běhy. Dále musí být maximální absorbance konzistentní s předchozími zkušenostmi. Značná odchylka od zavedené činnosti může udávat nepozorovanou změnu v experimentálních podmínkách nebo znehodnocení reagensů kitu. Je třeba použít čerstvé reagensie pro zjištění příčiny odchylek.

CHARAKTERISTIKY ČINNOSTI

Preciznost

Rozptyl v rámci analýzy

Rozptyl v rámci analýzy byl stanoven opakovaným (20x) měřením třech různých kontrolních sér v jedné analýze. Rozptyl v rámci analýzy je $\leq 10.0\%$.

Rozptyl mezi analýzami

Rozptyl mezi analýzami byl stanoven opakovaným (10x) měřením třech různých kontrolních sér v různých šaržích. Rozptyl mezi analýzami je $\leq 9.5\%$.

Přesnost

Výtěžnost 0.4 – 0.8 – 1.6 – 3.2 ng/mL androstendionu přidaného ke vzorku poskytla průměrnou hodnotu (\pm SD) $100.91\% \pm 5.61\%$ vztaheno na původní koncentrace.

Test ředění vykonaný na třech sérech zředěných 2 – 4 -6 -8 -16 krát poskytl průměrnou hodnotu (\pm SD) $107.18\% \pm 3.03\%$.

Specifická

Křížová reakce protilátky vypočtena při 50% podle Abrahama je uvedena v tabulce:

Androstendion	100%
5 α -dihydrotestosteron	0.05%
DHEA	0.05%
Epitestosteron	0.04%
DHEA-S	0.027%
Kortizol	0.008%
Progesteron	0.007%
Estron	0.007%
Testosteron	< 0.001 %
17B-estradiol	< 0.001 %
Estriol	< 0.001 %
Aldosteron	< 0.001 %

Čitlivost

Nejnižší stanovitelná koncentrace androstendionu rozlišitelná od nulového kalibrátoru je 0.01 ng/mL při 95% konfidenčním limitu.

Korelace

Dialab kit androstendion byl porovnán s komerčně dostupnou chemiluminiscenční metodou.

Bylo analyzováno 60 vzorků séra pomocí obou testovacích systémů.

Byla vypočtena lineární regresní křivka:

$$Y = 0.92 \cdot X - 0.02$$

$$r = 0.84$$

NÁVAZNOST

Návaznost hodnot přiřazených kalibrátoru: SIGMA A9630, 4-Androstene-3, 17-dione, (Prášek, Čistota (HPLC) $\geq 98\%$)

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Referenční hodnoty androstendionu v séru nebo plazmě jsou:

		ng/mL
ŽENY	Folikulární fáze	0.75 – 3.1
	Luteinická fáze	0.94 – 3.2
MUŽI		0.60 – 2.7

Povšimněte si prosím faktu, že stanovení rozsahu očekávaných hodnot pro „normální“ populaci pro danou metodu závisí na mnoha faktorech, jako specifická a citlivost použité metody a druh zkoumané populace. Proto by měla každá laboratoř brát rozsah udávaný výrobcem jako obecné doporučení a vytvořit si vlastní rozsah očekávaných hodnot na základě vlastní populace, v místě kde laboratoř působí.

OMEZENÍ

- Kit je určen pouze pro in vitro použití kvalifikovaným personálem. Ne pro vnitřní nebo vnější užití u lidí nebo zvířat.
- Klinický význam stanovení androstendionu může být zneplatněn, pokud byl pacient léčen kortizonem nebo přírodními nebo syntetickými steroidy.
- Tato metoda umožňuje stanovení androstendionu od 0.1 ng/mL po 10 ng/mL.

LIKVIDACE ODPADU

Reagencie je třeba likvidovat podle místních nařízení.

LITERATURA

1. Judd. H. Yen S. J.Clin. Endocr. & Metab., 36, 475 (1973)
2. Abraham G, J. Clin. Endoc. & M. 39,340 (1974)
3. Hillier S. G. and De Zwart F.
4. 79th Year book Medical Publishers Inc. Chicago (1985)
5. Venturoli S. et al Aspects in Adolescence with Menstrual Irregularities Fertility and Sterility, 48 (1), 78 (1987)
6. Venturoli S. et al Hormone Res., 24,269 (1986)

POUŽITÉ SYMBOLY

Symbol

Popis

Obsah

Cont.



2 °C

