

DHT-ELISA

AAE-1900 



DHT ELISA

Per la determinazione quantitativa del Diidrotestosterone in siero umano
AAE-1900

USO DIAGNOSTICO IN VITRO

it

1 INDICAZIONI D'USO

Per la determinazione quantitativa diretta del Diidrotestosterone mediante dosaggio immunoenzimatico in campioni di siero umano. Esclusivamente per *uso diagnostico in vitro*.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il principio di questo test immunoenzimatico sfrutta il tipico meccanismo del legame competitivo. La competizione avviene tra antigene non marcato (presente nei calibratori, nei controlli e nel siero dei pazienti) e antigene marcato con enzima (coniugato), per un numero limitato di siti di legame anticorpale in piastre con micro pozzetti. La rimozione del materiale avviene tramite una fase di lavaggio e decantazione. Al lavaggio segue l'aggiunta del substrato enzimatico. La reazione enzimatica viene quindi arrestata mediante aggiunta della soluzione stop. Si procede quindi alla lettura dell'assorbanza mediante lettore per micropiastre. L'intensità della colorazione sviluppatasi è inversamente proporzionale alla concentrazione di DHT presente nel campione. La curva di calibrazione, ottenuta grazie all'utilizzo di calibratori, consente quindi la lettura diretta dei livelli di DHT nei campioni dei pazienti e nei controlli.

3 APPLICAZIONI CLINICHE

Il 5 α -diidrotestosterone (DHT) è uno steroide simile al testosterone e all'androstenedione, appartenente alla classe degli androgeni. Il DHT è uno steroide a 19 atomi di carbonio, caratterizzato da attività androgenica. La produzione di androgeni avviene principalmente nelle cellule di Leydig del testicolo. Gli androgeni circolano nel sangue legati a proteine, in particolar modo alla globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG) e all'albumina. Le quantità minime di tali ormoni steroidei che circolano nel sangue in forma non-legata sono note come frazioni libere. Il DHT presenta un'affinità di legame per l'SHBG almeno tripla rispetto a quella del testosterone. Nell'uomo, il 70% circa del DHT deriva dalla conversione periferica del testosterone mentre nella donna la maggior parte del DHT deriva dall'androstenedione.

Il principale organo deputato alla neutralizzazione degli androgeni è il fegato, a livello del quale avvengono le principali modificazioni strutturali degli ormoni steroidei generalmente considerate come il prerequisito per la loro inattivazione biologica. Alcuni metaboliti vengono formati e altri vengono reimmessi nella circolazione sanguigna prima dell'escrezione renale. L'eliminazione degli ormoni steroidei dall'organismo viene conseguentemente effettuata attraverso l'urina. Significati clinici:

Nella Sindrome di Klinefelter, il livello di DHT è molto ridotto rispetto a quello riscontrabile in soggetti maschili normali.

Nell'irsutismo idiopatico, il 40% circa dei soggetti presenta un aumento del livello di DHT.

Nell'ovaio policistico (PCO), il 35% circa delle pazienti presenta un aumentato livello di DHT.

Il riscontro nei soggetti giovani di un livello di DHT molto maggiore rispetto a quello evidenziabile in soggetti normali più adulti, riflette l'aumentata produzione di androgeni in fase puberale che da avvio al processo mascolinizzante. È stato dimostrato che il DHT viene prodotto dal testicolo umano, con probabile origine all'interno dei tubuli seminiferi. In caso di danno tubulare, la produzione di DHT risulta infatti ridotta, con un decremento rilevabile dei livelli plasmatici di DHT (pazienti affetti da aplasia delle cellule germinali e azoospermia).

In pazienti affetti da anorchia, la concentrazione plasmatica di DHT è molto ridotta.

È stato evidenziato come in alcuni casi di cancro prostatico (specialmente allo stadio D), la determinazione dei livelli di DHT possa essere utile nella previsione della risposta ad una terapia antiandrogena.

4 PRECAUZIONI PROCEDURALI E AVVERTENZE

- 1 Per un corretto utilizzo del kit, è essenziale la totale comprensione del protocollo da parte dell'utilizzatore. L'attendibilità del test è garantita unicamente dallo stretto e completo rispetto delle istruzioni d'uso.
- 2 Per valutare l'attendibilità dei risultati è necessario l'inserimento in ogni sessione analitica di materiali di controllo o pool di sieri ad elevata e bassa concentrazione.
- 3 Qualora sia prevista l'aggiunta di acqua per la diluizione o per la ricostituzione, si utilizzi acqua deionizzata o distillata.
- 4 Per ridurre al minimo l'esposizione a sostanze potenzialmente nocive durante la manipolazione dei reagenti del kit e dei campioni umani, si raccomanda l'utilizzo di appositi guanti.
- 5 Prima dell'uso, tutti i reagenti del kit e i campioni dovranno essere portati a temperatura ambiente e miscelati delicatamente ma con accuratezza. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei reagenti e dei campioni.
- 6 Tracciare una curva di calibrazione per ogni sessione analitica.
- 7 In ogni sessione analitica dovrà essere inserito un controllo i cui valori dovranno rientrare nei limiti di confidenza stabiliti.
- 8 Per quanto riguarda il controllo, una procedura analitica non corretta, l'imprecisione nel pipettaggio, un lavaggio incompleto o la conservazione inadeguata dei reagenti potrebbero essere responsabili del riscontro di valori di dosaggio esterni ai ranges prestabiliti.

- 9 Nella fase di lettura delle micropiastre, la presenza di bolle all'interno dei micropozzetti può influenzare i valori di densità ottica (OD). Rimuovere attentamente qualsiasi bolla prima di procedere alla fase di lettura.
- 10 La soluzione del substrato (TMB) è sensibile alla luce e, se correttamente conservata, deve essere incolore. Un'eventuale instabilità o contaminazione saranno evidenziate da sviluppo di una colorazione blu. In tal caso, la soluzione non potrà essere utilizzata.
- 11 Nella distribuzione del substrato e della soluzione stop, non utilizzare pipette nelle quali tali liquidi possano venire a contatto con parti metalliche.
- 12 Per evitare la contaminazione dei reagenti, utilizzare un nuovo puntale monouso per ogni distribuzione di reagente, campione, calibratore o controllo.
- 13 Nell'ambito di uno stesso test, non utilizzare componenti appartenenti a lotti diversi e non utilizzare alcun componente che abbia superato la data di scadenza riportata sull'etichetta.
- 14 I reagenti del kit devono essere considerati materiale pericoloso e il loro smaltimento dovrà essere effettuato in accordo alle vigenti normative nazionali.

5 LIMITI

1. Tutti i reagenti contenuti nei kit sono calibrati per la determinazione diretta di DHT in siero umano. Il kit non è calibrato per la determinazione di DHT in saliva, plasma o in altre tipologie di campioni di origine animale.
2. Non utilizzare campioni di siero fortemente emolizzato, fortemente lipemico, itterico o conservato in maniera scorretta.
3. Campioni o sieri di controllo contenenti azide o tiomersale non sono compatibili con l'esecuzione di questo test poiché potrebbero generare falsi risultati.
4. Soltanto il calibratore 0 può essere utilizzato per diluire campioni di siero ad alto contenuto. L'impiego di qualsiasi altro reagente potrebbe generare falsi risultati.
5. I risultati ottenuti con questo kit non devono mai essere utilizzati come base unica per la formulazione di una diagnosi clinica. La presenza di anticorpi eterofili in soggetti regolarmente a contatto con animali o con prodotti animali costituisce per esempio un potenziale rischio di interferenza nei test immunologici. Pertanto, nel caso in cui si sospettino falsi risultati, la diagnosi clinica dovrà basarsi sulla valutazione di tutti i dati disponibili sul paziente, inclusa la frequenza di esposizione a prodotti/animali.

6 PRECAUZIONI DI SICUREZZA E AVVERTENZE

MATERIALI BIOLOGICI POTENZIALMENTE PERICOLOSI

Il siero umano utilizzabile per la preparazione di calibratori e controlli è stato testato e riscontrato non-reattivo per antigene di superficie del virus dell'Epatite B. Esso è stato inoltre testato e riscontrato negativo per presenza di anticorpi anti-HCV e anti-Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV). Tuttavia, nessuna metodica analitica è in grado di fornire una garanzia totale dell'assenza di HIV, HCV e virus dell'Epatite B e di qualsiasi altro agente infettivo. I reagenti dovranno pertanto essere considerati potenzialmente pericolosi e dovranno essere manipolati nel rispetto delle misure precauzionali applicate nel trattamento di qualsiasi campione di sangue.

PRODOTTI CHIMICI PERICOLOSI

Evitare il contatto con reagenti contenenti TMB, perossido di idrogeno e acido solforico. In caso di contatto con uno di questi reagenti, sciacquare abbondantemente con acqua. Il TMB è un sospetto agente cancerogeno.

7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Per il dosaggio in duplicato è richiesta una quantità pari a circa 0,2ml di siero. Versare 4-5ml di sangue in una provetta accuratamente contrassegnata e lasciare coagulare. Centrifugare e trasferire il siero.

Conservare a 4°C per un massimo di 24 ore o a temperatura pari o inferiore a -10°C se l'analisi verrà effettuata ad una distanza di tempo maggiore.

Considerare tutti i campioni umani come materiali potenzialmente pericolosi e assumere le debite precauzioni per la loro manipolazione.

8 PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Questo test è un sistema diretto e non necessita di alcun pretrattamento dei campioni.

9 REAGENTI E STRUMENTAZIONE RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Pipette di precisione per la distribuzione di 50, 100, 150 e 300 µl
2. Puntali monouso
3. Acqua distillata o deionizzata
4. Agitatore per piastre (200 rpm)
5. Lettore per micropiastre con set di filtri a 450 nm e linearità di 3,0 OD o superiore* (vedi "Procedura del test", passaggio 10)

10 REAGENTI FORNITI

1.

	Piastra con Micropozzetti Rivestiti di anticorpo anti-DHT di coniglio – Pozzetti frazionabili – Pronti per l'uso
---	---

Contenuto: Una piastra da 96 (12x8) micropozzetti rivestiti con anticorpi policlonali, contenuta in una busta richiudibile fornita di dissecante

Conservazione: Refrigerare a 2-8°C.

Stabilità: Dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

2.

Ag	HRP	CONC
----	-----	------

Coniugato Diidrotestosterone – Perossidasi di Rafano (HRP) Concentrato – x100

Contenuto: Coniugato DHT-HRP in tampone proteico, con un conservante privo di mercurio.

Volume: Fiala da 200 µl

Conservazione: Refrigerare a 2-8°C

Stabilità: Dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Preparazione: Prima dell'uso, diluire **1:100** in tampone del coniugato (es. 20 µl di Coniugato HRP in 2 ml di tampone del coniugato). Nel caso si voglia utilizzare l'intera piastra, diluire 120 µl di Coniugato HRP in 12 ml di tampone del coniugato.
Eliminare ogni parte residua.

3.

CAL	N
-----	---

Calibratori di diidrotestosterone – Pronti per l'uso.

Contenuto: N= 0-5. CAL 0: fiale da 0,6 ml, CAL 1-5: fiale da 2 ml

Sei fiale contenenti DHT in tampone proteico, con un conservante privo di mercurio. Preparati aggiungendo quantità definite di DHT al tampone.

I valori esatti sono riportati sulle rispettive etichette.

Conservazione: Refrigerare a 2-8°C.

Stabilità: Nelle fiale ancora sigillate: dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Dopo apertura delle fiale: i calibratori dovranno essere utilizzati entro 14 giorni o frazionati in aliquote da congelare. Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

4.

CONTROL	1
---------	---

Controllo – Pronto per l'uso

Contenuto: N=1. Una fiala contenente DHT in tampone proteico, con un conservante privo di mercurio. Preparato aggiungendo una quantità definita di DHT al tampone.

Il valore atteso e il range di accettabilità sono riportati sull'etichetta della fiala.

Volume: Fiala da 0,6 ml

Conservazione: Refrigerare a 2-8°C

Stabilità: Nella fiala ancora sigillata: dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Dopo l'apertura della fiala: il controllo dovrà essere utilizzato entro 14 giorni o frazionato in aliquote da congelare. Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

5.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampone per Lavaggio Concentrato – x10

Contenuto: Un flacone contenente tampone con un detergente non-ionico e un conservante privo di mercurio.

Volume: Flacone da 50 ml

Conservazione: Refrigerare a 2-8°C.

Stabilità: Dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Preparazione: Prima dell'uso, diluire 1:10 con acqua distillata o deionizzata. Se si utilizza l'intera piastra, diluire 50ml di Tampone per Lavaggio Concentrato utilizzando 450 ml di acqua.

6.

CONJ	BUF
------	-----

Tampone del Coniugato – Pronto per l'uso

Contenuto: Una fiala contenente un tampone proteico e un conservante privo di mercurio.
Volume: Fiala da 15 ml
Conservazione: Refrigerare a 2-8°C
Stabilità: Dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

7.

CHROM	TMB
-------	-----

Soluzione del Substrato TMB – Pronto per l'uso

Contenuto: Un flacone contenente tetrametilbenzidina e perossido di idrogeno in un tampone privo di DMF o DMSO.
Volume: Flacone da 16 ml
Conservazione: Refrigerare a 2-8°C
Stabilità: Dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

8.

STOP	SOLN
------	------

Soluzione Stop – Pronta per l'uso

Contenuto: Una fiala contenente acido solforico 1M.
Volume: Fiala da 6ml
Conservazione: Refrigerare a 2-8°C
Stabilità: Dodici mesi o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

11 PROCEDURA DEL TEST

Pretrattamento dei campioni: Nessuno

Tutti i reagenti devono aver raggiunto la temperatura ambiente prima del loro utilizzo. Calibratori, controlli e campioni devono essere testati in duplicato. Una volta avviata la procedura, tutti i passaggi dovranno essere completati senza interruzioni.

1. Preparare le soluzioni di lavoro del Coniugato DHT-HRP e del tampone per lavaggio.
2. Prelevare dalla busta il numero di strip di micropozzetti necessari per il dosaggio. Risigillare la busta e riportare i micropozzetti inutilizzati nel frigorifero.
3. Pipettare in duplicato 50 µl di ciascun calibratore, controllo e campione nei rispettivi pozzetti opportunamente contrassegnati.
4. Pipettare 100 µl di soluzione di lavoro del Coniugato in tutti i pozzetti (si consiglia di utilizzare una pipetta multicanale).
5. Incubare su un agitatore per micropiastre (200 rpm circa), per un'ora a temperatura ambiente.
6. Lavare per tre volte i pozzetti ciascuno con 300 µl di tampone per lavaggio diluito, e picchiettare con decisione la piastra su carta assorbente per garantirne l'asciugatura (è consigliabile l'utilizzo di un lavatore per micro piastre).
7. Pipettare 150 µl di soluzione del substrato TMB in tutti i pozzetti ad intervalli di tempo regolari.
8. Incubare su agitatore per piastre, a temperatura ambiente per 10-15 minuti (o fino al momento in cui il calibratore 0 assume la colorazione blu corrispondente alla OD desiderata)
9. Pipettare 50 µl di soluzione stop in tutti i pozzetti rispettando gli stessi intervalli di tempo del passaggio 7.
10. Effettuare la lettura su apposito lettore per piastre a micropozzetti, con filtro a 450 nm, entro 20 minuti dall'aggiunta della soluzione stop.

• Nel caso in cui la OD superasse il limite di rilevabilità o il filtro da 450 nm non fosse disponibile, potranno essere utilizzati in alternativa filtri da 405 nm o da 415 nm. Le densità ottiche risulteranno inferiori senza alcuna conseguenza sui risultati dei campioni dei pazienti e dei controlli.

12 CALCOLO DEI RISULTATI

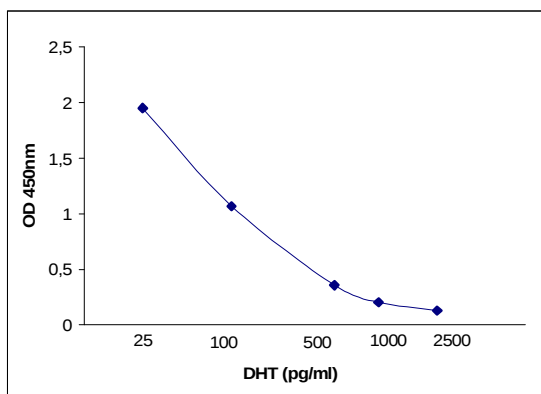
1. Calcolare la media delle densità ottiche per ogni calibratore in duplicato.
2. Tracciare la curva di calibrazione su carta semi-log riportando la media delle densità ottiche sull'asse delle Y e le concentrazioni dei calibratori sull'asse delle X. In caso di utilizzo di un software per immunodosaggi, si raccomanda l'impiego di una curva a 4 parametri.
3. Calcolare la media delle densità ottiche per ciascun campione in duplicato.
4. Ricavare i valori relativi ad ogni campione direttamente dalla curva di calibrazione.
5. In caso di letture superiori a 2500 pg/ml, diluire il campione utilizzando il calibratore 0 fino ad una diluizione massima di 1:8. Il risultato ottenuto dovrà essere moltiplicato per il fattore di diluizione.

DATI TIPICI

Calibratore	OD 1	OD 2	OD media	Valore (pg/ml)
0	2,320	2,279	2,300	0
1	1,976	1,928	1,952	25
2	1,058	1,077	1,068	100
3	0,359	0,354	0,357	500
4	0,222	0,205	0,214	1000
5	0,131	0,128	0,130	2500
Campione	0,515	0,507	0,511	300

CURVA DI CALIBRAZIONE TIPICA

Tale curva è soltanto un esempio. Non deve essere utilizzata per calcolare i valori dei campioni.



13 CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

13.1 SENSIBILITA'

La concentrazione minima rilevabile è stata calcolata per interpolazione sulla curva di calibrazione del valore medio di OD del calibratore 0 (test effettuato su 10 replicati) meno 2DS. La sensibilità del kit Dihydrotestosterone ELISA è pari a 6,0 pg/ml.

13.2 SPECIFICITA' (REATTIVITA' CROCIATA)

I seguenti composti sono stati testati per verificare la reattività crociata relativa al kit Direct Dihydrotestosterone ELISA. Il diidrotestosterone ha mostrato una reattività crociata del 100%.

Steroide	Reattività crociata %
Diidrotestosterone	100
Testosterone	8,7*)
5 β Diidrotestosterone	2.0
Androstenedione	0.2

*) Tale reattività crociata non influenza i risultati di questo test ELISA grazie ad uno specifico sistema tampone complessante che blocca il legame del testosterone all'anticorpo.

I seguenti steroidi sono stati ugualmente testati ma hanno mostrato una reattività crociata inferiore allo 0,01%:

Solfato di Deidroepiandrosterone, 17 β -Estradiolo, Estriolo, Estrone, Progesterone, 17-OH Progesterone, Cortisolo e Pregnenolone.

13.3 PRECISIONE INTRA-DOSAGGIO

Tre campioni sono stati testati 10 volte ciascuno, utilizzando la stessa curva di calibrazione. I risultati (in pg/ml) sono riportati nella tabella qui di seguito:

Campione	Media	SD	CV%
1	236,74	26,89	11,4
2	869,03	47,41	5,46
3	1008,14	39,36	3,90

13.4 PRECISIONE INTER-DOSAGGIO

Tre campioni sono stati testati 10 volte in un arco di tempo di 4 settimane. I risultati (in pg/ml) sono riportati nella tabella qui di seguito:

Campione	Media	SD	CV%
1	280,88	34,07	12,1
2	721,40	54,20	7,5
3	1025,41	60,45	5,9

13.5 RECUPERO

Ai campioni di siero di tre pazienti sono state aggiunte quantità definite di DHT. I risultati (in pg/ml) sono riportati nella tabella qui di seguito:

Campione	Risultati osservati	Risultati attesi	Recupero %
1 Non addizionato	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 Non addizionato	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 Non addizionato	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

13.6 LINEARITA'

I campioni di siero di tre pazienti sono stati diluiti utilizzando il calibratore 0. I risultati (in pg/ml) sono riportati nella tabella qui di seguito.

Campione	Risultati osservati	Risultati attesi	Recupero %
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

13.7 STUDI COMPARATIVI

Il kit Dihydrotestosterone ELISA (kit A) è stato messo a confronto con un kit RIA basato su meccanismo di competizione in provette rivestite (kit B). I risultati (pg/ml) sono riportati nella tabella qui di seguito:

Gruppo	N	Media kit A	Media kit B
Femmine	10	95,5	99,0
Maschi	10	280,0	252,0

13.8 VALORI NORMALI ATTESI

Come per qualsiasi altro dosaggio clinico, il laboratorio deve raccogliere i dati e stabilire il proprio range di normalità,

Gruppo		Range (pg/ml)
Femmine	Premenopausa	24-368
	Postmenopausa	10-181
Maschi		250-990

14 BIBLIOGRAFIA

1. Bassett, R.M., A simple chromatographic method for the radioimmunoassay of four androgenic steroids, Medical Laboratory Sciences, 37:31, 1980,
2. Baxendale, P.M., et al., Plasma and salivary androstenedione and dihydrotestosterone in women with hyperandrogenism, Clinical Endocrinology, 18:447, 1983,
3. 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,
4. 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,
5. 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,
6. Hammond, G.L., et al, The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermatoc and peripheral venous blood, J, Clin, Endocr, Metab, 45:16, 1977,
7. Ito, T., et al, Dihydrotestosterone in human peripheral plasma, J, Clin, Endocr, 31:362, 1970,
8. Mean, F., et al, Study of the binding of dihydrotestosterone, testosterone and oestradiol with sex hormone binding globulin, Clinica Cernica Alta 80:171, 1977,
9. Mooradian, A.D., et al, The biological actions of androgens, Endocr, Rev, 8:1-28, 1987,
10. Pazzagli, M., et al, Radioimmunoassay of plasma dihydrotestosterone in normal and hypogonadal men, Clin, Endocr, 82:380, 1976,
11. Wakelin, K., et al, Relationship of 5 β dihydrotestosterone and 5 α dihydrotestosterone to testosterone in health and disease, J, Endocrinol, 87:450, 1980,
12. Wang, C., et al, Solitary androgens in hirsutism: Are they of use in routine evaluation, Ann, Clin, Biochem, 23:590, 1986,
13. Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays, Clin, Chemistry 45:7, 1999,
14. 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,

Data di revisione : 2022-05-19



Meridian Healthcare srl

Tel. +39 095 725 68 69 Fax: +39 095 725 44 54
info@meridianhealthcare.it
www.meridianhealthcare.it

