

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА СУЛЬФАТА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

EIA-1562, DHEA-S

Каталог. № : EIA-1562
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2007
Версия 6.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. ВВЕДЕНИЕ

Дегидроэпиандростерон (5-Андростерон-3 β -OL-17-один, Андростенон, Дегидроизоандростерон, Трансдегидроандростерон, DHEA) это стероидный гормон, который есть в крови в сульфатной форме (DHEA-S).

DHEA-S это специфический продукт и измерения этого стероида используется в медицинской практике. Медицинское значение тестирования плазмы DHEA-S связано с диагностикой адреналовой гиперплазии и разнообразной диагностикой гирсутизма.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG DHEA-S ELISA базируется на принципе конкуренции и планшетного разделения.

Ячейки микропланшета покрыты поликлональным антителом, направленным против уникальной антигенной стороны DHEA-S молекулы.

Эндогенный DHEA-S образцов пациентов конкурирует с DHEA-S, конъюгированного с пероксидазой конкурируют за связывание с антителом, которым покрыто дно лунок. После инкубации планшет промывается.

Количество связанного конъюгата пероксидазы обратно пропорционально концентрации DHEA-S в образце. После добавления раствора субстрата интенсивность развитого окраса обратно пропорционально концентрации DHEA-S в образце.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Для диагностики in vitro.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора, содержащей 0,5 М H₂SO₄. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Данные паспорта безопасности доступны по требованию.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микрострипы**, 12x8 стрипов, 96 ячеек
Ячейки покрытые анти- DHEA-S антителом
2. **Стандарт (стандарт 0-6)**, 7 фл., 1 мл, готовый к использованию.
Концентрации: 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 мкг/мл.
Конверсия: 1 мкг/мл=2,6 мкмоль/л.
Содержит 0,3% Проклина в качестве консерванта.
3. **Ферментный конъюгат**, 1 фл., 25 мл, готовый к использованию
Анти-DHEA-S антисыворотка, конъюгированная с пероксидазой.
Содержит 0,3% Проклина в качестве консерванта.
4. **Раствор субстрата**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию.
ТМБ
5. **Стоп раствор**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию
H₂SO₄ 0,5М.
Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать ожег.
6. **Раствор для промывания (40x)**, 1 фл., 30 мл
Смотр. «Приготовление реагентов».

Примечание: Дополнительный 0 стандарт для разбавления образца доступен по запросу.

4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы

1. Микропланшетный считыватель, способный проводить измерения при 450 нм (± 10 нм).
2. Калиброванные дозаторы.
3. Абсорбирующая бумага.
4. Дистиллированная вода.

4.2 Условия хранения

При хранении при 2-8^oC неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8^oC. Микропланшет необходимо хранить при 2-8^oC.

Микропланшет стабилен в плотно упакованном виде.

4.3 Приготовление реагентов

Приведите все реагенты и стрипы, что будут использоваться, к комнатной температуре.

Промывочный раствор

Добавьте неионизированной воды к 40x концентрированному промывочному раствору.

Разбавьте 30 мл концентрированного промывочного раствора с 1170 мл деионизированной воды чтобы достичь окончательный объем 1200 мл.

Разбавленный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

4.4 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности.

4.5 Поврежденные наборы

При повреждении набора или компонентов, необходимо уведомить производителя в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

5. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность стуситься и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и центрифугировать после забора.

(Например, для EDTA плазмы - Sarstedt Monovette – красная крышка - # 02.166.001; для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette – оранжевая крышка - # 02.165.001; для цитратной плазмы - Sarstedt Monovette – зеленая крышка - # 02.167.001)

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 5 дней при 2-8^oC.

Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить 10- или 100-кратно 0 стандартом и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

Например:

а) Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);

б) Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте)

6. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

6.1 Общие замечания

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
- В основном, энзимная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

6.2 Проведение анализа

Каждая процедура должна включать использование стандартной кривой.

1. Закрепите необходимое количество микротитровальных полосок в держателе.
2. Внесите **25 мкл** DHEA-S стандартов, контролей и образцов, используя новые наконечники, в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **200 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку планшета. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **60 минут** при комнатной температуре (не накрывая планшет).
5. Вытряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **3 раза** (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.
Важное замечание:
Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Добавьте **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **50 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм \pm 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Типичный пример стандартной кривой:

Стандарт		Оптич. единицы
Стандарт 0	0 мкг/мл	1,69
Стандарт 1	0,1 мкг/мл	1,35
Стандарт 2	0,5 мкг/мл	0,93
Стандарт 3	1 мкг/мл	0,67

Стандарт 4	2,5 мкг/мл	0,46
Стандарт 5	5 мкг/мл	0,33
Стандарт 6	10 мкг/мл	0,23

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, что каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

При изучении очевидно здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие данные:

Мужчина: <50 лет 0,59-2,96 мкг/мл
>50 лет среднее: 1,01 мкг/мл

Женщина: <50 лет 0,40-2,17 мкг/мл
>50 лет среднее: 0,63 мкг/мл

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Хорошая лабораторная практика требует проводить проверку контролей с каждой калибровочной кривой. Для определения средних значений и приемлемых диапазонов для обеспечения правильности процедуры требуется анализ статистически значимого количества контролей.

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Значения и диапазоны, указанные в сертификате контроля качества всегда соответствуют данному лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0-10 мкг/мл

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность:

Стероид	% перекрестных реакций
DHEA-S	100
Андростенедион	20,9
Андростерон	8,5
Андростерон-сульфат	< 0,1
Прогестерон	4,7
Тестостерон	0,3
Эстрон	0,9
Эстриол	< 0,1
17- β -Эстрадиол	<0,1
Эстрадиол Сульфат	<0,1
Кортизол	< 0,1

9.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена из среднего минус двух стандартных отклонений от 20 анализов репликатов нулевого стандарта и была определена как 0,044 мкг/мл.

9.4 Точность

9.4.1 Вариативность внутри анализа

Образец	n	Среднее мкг/мл	КВ %
1	20	0,2	4,6
2	20	1,3	5,1
3	20	4,2	4,7

9.4.2 Вариативность между анализами

Образец	n	Среднее мкг/мл	КВ %
1	20	0,2	6,5
2	20	1,3	10,6
3	20	4,4	5,4

9.5 Воспроизводимость

Образцы были обогащены добавлением DHEA-S раствора при известной концентрации 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены добавлением половины значений, определенных для неразбавленных образцов и половины значений для известных растворов. % восстановления был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Сыворотка	Добавленная конц. 1:1 (v/v) (мкг/мл)	Измеренная конц. мкг/мл	Ожидаемая конц. мкг/мл	Извлечение %
1	-	0,2	0,20	100
	1,0	0,7	0,60	109
	2,5	1,4	1,35	106
	5,0	2,8	2,60	108
2	-	1,1	1,10	100
	1,0	1,1	1,05	101
	2,5	2,1	1,80	114
	5,0	3,4	3,05	110
3	-	3,8	3,80	100
	1,0	2,8	3,15	91
	2,5	4,3	4,40	97
	5,0	7,0	6,90	102

9.6 Линейность

Сыворотка	Фактор разведения	Средн. конц., мкг/мл	Воспроизводимость (%)
1	неразведенный	4,825	—
	1:2	2,505	104
	1:4	1,191	99
	1:8	0,644	107
	1:16	0,320	106
2	неразведенный	1,147	—
	1:2	0,620	108
	1:4	0,310	108
	1:8	0,153	107
	1:16	0,078	109
3	неразведенный	4,200	—
	1:2	2,116	101
	1:4	1,024	98
	1:8	0,486	93
	1:16	0,264	101

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Неправильное обращение с образцами или модификация теста могут влиять на результаты.

10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 7,5 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

«Хук-эффекта» в данном анализе не наблюдалось.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверны только, если контроли попадают в указанные границы, и если все другие параметры соответствуют спецификации.

11.2 Терапевтическое заключение

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

11.3 Ответственность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не являются под ответственностью производителя.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com