

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОНУ

7425-300, Dehydroepiandrosterone (DHEA) Test System

Каталог. №: 7425-300

Методика від 16-07-2019

Кількість : 96

Версія 3

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цільове використання: Кількісне визначення концентрації сульфату Дегідроепіандростерону в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

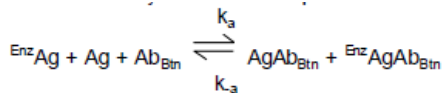
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (ТИП 7):

Необхідні для ІФА реагенти включають: антитіла, кон'югат фермент-антиген, нативний антиген.

При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається конкурентна реакція між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість зв'язуючих сайтів антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Біотинильовані х-DHEA IgG антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

AgAb_{Btn} = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = Комплекс кон'югат - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a / k_{-a}$ = константа рівноваги

Одночасно відбувається реакція між біотином, прикріпленим до антитіл, і стрептавідином, прикріпленим до мікролунок. Це дозволяє відділити зв'язану фракцію антитіл після декантації/аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ – іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

А. Калібратори DHEA - 1 мл/флакон

6 флаконів референсної сироватки для DHEA з концентраціями 0 (A), 0.5 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 10.0 (E) і 30.0 (F) нг/мл. Зберігати при 2-8 °C. Містять консерванти. Калібратори можуть бути виражені в молярних концентраціях (нМ/л) шляхом множення на 3.47.

Наприклад: 1 нг/мл x 3.47 = 3.47 мкМ/л

В. Ферментний реагент DHEA – 6 мл/флакон

Один (1) флакон кон'югату DHEA (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в стабілізуючій білковій матриці з червоним барвником. Зберігати при температурі 2-8 °C.

С. Біотиновий Реагент DHEA - 6 мл/флакон

Один (1) флакон реагенту містить кон'югат анти-DHEA біотинильованих очищених IgG кролика в буфері, з синім барвником та консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

Д. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл Стрептавідину і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

Е. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

Ф. Субстратний розчин - 12 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

Г. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5M H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C.

Н. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Дозатори регульованого об'єму (200-1000 мкл) для кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
8. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
9. Таймер.
10. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками має бути кров; сироватка або гепаринізована плазма за типом, забір яких проводиться з урахуванням звичайних заходів обережності для збору проб венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період

до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

Зауваження 1: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного референсного калібратора сироватки, контрольного зразка та зразка пацієнта для аналізу в двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 25 мкл референсного калібратора сироватки, контрольного зразка та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 50 мкл Ферментного реагенту DHEA у кожен лунку.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) Біотинового Реагенту анти-DHEA в усі лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Накрити і інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Розвести зразки, концентрація яких, можливо, вище 30 нг/мл 1:5 з '0' нг/мл калібратором DHEA.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації DHEA в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту

залежно від концентрації DHEA в мкг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).

- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації DHEA в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.68 перетинає стандартну криву при 2.36 нг/мл (див. мал.1)

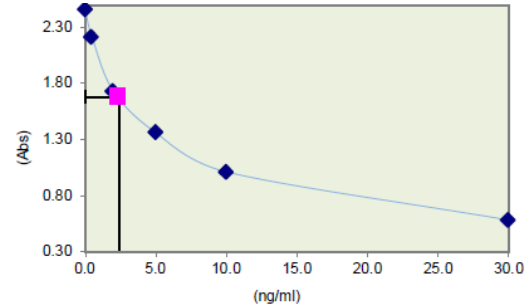
Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.484	2.463	0.0
	B1	2.442		
Калібратор В	C1	2.254	2.209	0.5
	D1	2.164		
Калібратор С	E1	1.770	1.727	2.0
	F1	1.684		
Калібратор D	G1	1.423	1.379	5.0
	H1	1.336		
Калібратор E	A2	1.029	1.006	10.0
	B2	0.983		
Калібратор F	C2	0.592	0.577	30.0
	D2	0.561		
Контроль 1	G2	2.108	2.150	0.62
	H2	2.193		
Пацієнт 1	A3	1.707	1.680	2.36
	B3	1.651		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «0» мкг/мл повинна бути ≥ 1.8 .
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.

7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ELISA були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Клінічно значення **DHEA-S само по собі не є діагностичним значенням** і повинно бути використане тільки в поєднанні з іншими клінічними проявами (спостереженнями) і діагностичними процедурами.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених довідкових інтервалів для "нормального" дорослого населення, очікувані діапазони для тестової системи AccuBind® ELISA DHEA докладно описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для системи DHEA AccuBind® ELISA Test

	(ng/ml)
Male	1.8 – 12.5
Female	1.3 – 9.8

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватись на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору DHEA всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	16	0.72	0.07	9.8
Нормальний	16	2.72	0.14	4.9
Високий	16	6.73	0.34	6.0

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	0.69	0.07	10.7
Нормальний	10	2.85	0.18	6.3
Високий	10	6.89	0.41	6.0

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу – 0.10 нг/мл для даного набору.

14.3 Специфічність

% перехресної реактивності антитіл DHEA на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перехресна реактивність була обчислена шляхом виведення відношення між дозою додаткової речовини і дозою DHEA, необхідної для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

Substance	Cross Reactivity
DHEA	100.000
DHEA-S	0.004
Androstenedione	0.056
Corticosterone	0.004
Cortisol	0.001
Pregnenolone	0.070
Testosterone	0.002
Dihydrotestosterone	0.007
Estriol	<0.001
Estradiol	<0.001
Estrone	<0.001



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

