



## НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА (DHEA) МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения  
Дегидроэпиандростерона в сыворотке крови человека

Кат.№ CAN-DP-490  
Производитель: Diagnostics Biochem Canada Inc., (Канада)

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

Методика от 25-10-2010  
Версия 2.0

### ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения Дегидроэпиандростерона в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. Только для использования в in-Vitro 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 DHEA в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация DHEA в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(См. оригинал инструкции).

### ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 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.

10. 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.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

### ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения DHEA в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения DHEA в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Для разведения сывороток с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
5. 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

Данный анализ является прямым. 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 DHEA (с «ломаемыми» 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 DHEA-пероксидазы хрена (HRP)** – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат DHEA-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.  
Объем: 0.3 мл 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 1:100 в рабочем буфере (например, 20 мкл HRP в 2 мл буфера для анализов). При использовании всего микропланшета разведите 0.2 мл HRP в 20 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

**3. Калибраторы DHEA** - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих DHEA в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртуть. Приготовлены добавлением известного количества DHEA 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	0.2	0.6
Калибратор С	0.5	0.6
Калибратор D	4	0.6
Калибратор Е	10	0.6
Калибратор F	40	0.6

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: не вскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия калибраторы должны быть использованы в течение 14 дней или алиquotированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

**4. Контроли** – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие DHEA в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртуть. Приготовлен с добавлением определенного количества DHEA в буфер. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.  
Объем: 0.6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: не вскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или алиquotированы 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 ртуть.  
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 ртуть.  
Объем: 25 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

**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 1М 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 DHEA 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 меченные ячейки.
4. Пипетировать 150 мкл конъюгата рабочего раствора в каждую лунку (рекомендуется использование мультиканальной пипетки).
5. Инкубировать в течение 1 часа (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).
7. Пипетировать 150 мкл Субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковой скоростью.
8. 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).
9. Пипетировать 50 мкл стоп раствора в каждую лунку с одинаковой скоростью как в шаге 7.
10. 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, можна использовать фильтр с длиной волны 415 нм. ОП будут ниже, но это не повлияет на результаты.

### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
2. 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.
3. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
4. Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
5. Если результат превышает 40 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	2.193	2.189	2.191	0
B	1.984	2.001	1.993	0.2
C	1.806	1.814	1.810	0.5
D	0.864	0.911	0.888	4
E	0.543	0.526	0.535	10
F	0.273	0.245	0.259	40
неизвестный	0.398	0.368	0.383	20

**ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ** (См. оригинал инструкции).

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 DHEA ELISA составила **0.082 нг/мл**.

##### Специфичность (перекрестная реактивность):

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

Стероид	Перекрестная реактивность, %
DHEA	100
Андреностерон	0.282
Андростенедион	0.610
Андростерон	0.248
Холестерин	0.152
Кортикостерон	0.139
Кортизол	0.124
DHEAS	0.050
DHT	0.471
Эпиандростерон	4.555
Эстрадиол	0.196
Эстрон	0.173
Прогестерон	0.419
Прогестерон, 17-ОН	0.306
Тестостерон	0.496

##### 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	3.50	0.47	13.4
2	1.25	0.13	10.4
3	9.31	0.55	5.9

##### Точность между сериями:

3 образца анализировали 20 раз каждый, 2 раза в день. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	3.85	0.47	12.2
2	1.41	0.19	13.5
3	9.38	0.86	9.2

##### Воспроизводимость

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств DHEA к трем образцам сывороток пациентов. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице (См. оригинал инструкции).

##### Линейность

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

#### ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

Группа	Диапазон (нг/мл)
Мужчины	1 - 12
Женщины	3 - 11

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Черновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: [www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

[www.biotechlab-s.com.ua](http://www.biotechlab-s.com.ua)