

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА (DHEA)

CAN-DH-490, Dehydroepiandrosterone

Каталог. № : **CAN-DH-490**
Производитель: **Diagnosics Biochem
Canada Inc., (Канада)**

Методика от **25-10-2010**
Версия **2.0**



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

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

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставленной с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток с высоким и низким значениями должны быть включены в каждую постановку для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо надевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроли должны быть включены в каждую постановку. Их значения, полученные при тестировании, должны соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. 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.
9. 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

вид 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 ртути. Приготовлены добавлением известных количеств 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 E	10	0.6
Калибратор F	40	0.6

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С
Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия калибраторы должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы 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 ртути. 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: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или аликвотированы 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 ртути.
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 ртути.
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, можно 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



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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