

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОН СУЛЬФАТУ В СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ

2055-17, DHEA-S ELISA

Каталог. №: 2055-17

Методика від 01-11-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	Dehydroepiandrosterone Sulphate DHEA-S ELISA
Метод	Імуноферментний аналіз
Принцип	Конкурентний Кон'югованої Пероксидази ІФА
Діапазон визначення	0-200 нг/мл
Зразок	20 мкл сироватки
Специфічність	95 %
Чутливість	0.03 мкг/мл
Загальний час	~ 75 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців

* Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історії хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийняті до уваги.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір DAI DHEA-S ІФА є конкурентним імуноферментним колориметричним методом для кількісного визначення концентрації ДГЕА-С в сироватці або плазмі людини. Призначений тільки для лабораторного використання.

РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Дегідроепіандростерон сульфат (антиген) в зразку конкурує з пероксидазою хрому (HRP) за зв'язування на обмежену кількість сайтів анти-дегідроепіандростерону сульфату (антитіло) в мікропланшеті (тверда фаза). Після інкубації проводиться промивання. Після цього ферментний HRP у зв'язаній фракції реагує з субстратом (H₂O₂) і субстратом ТМБ, що призводить до забарвлення в синій колір, який змінюється на жовтий після додавання стоп-розчину. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації дегідроепіандростерону сульфату в зразку. Концентрації ДГЕА-С в зразку розраховують за калібрувальною кривою.

РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Матеріали, які входять до складу набору

- Стандарти DHEA-S 6x (1 флакон = 1 мл)
0,1 М фосфатний буфер, Na₂S₂O₃ < 0.1%, сироватка людини.
STD₀
STD₁
STD₂
STD₃
STD₄
STD₅
- Концентрат Розчину для розведення зразків 5X (1 пляшка) 20 мл
HEPES 187 mM, pH 7.5; BSA 0,5 г/л
- Кон'югат (1 пляшка) 12 мл
Кон'югат DHEA-S-HRP
- Мікропланшет (1 штука)
IgG DHEA-S, нанесені на планшет
- ТМБ Субстрат (1 флакон) 15 мл
H₂O₂-ТМБ 0.26 г/л
(Уникати попадання на шкіру)
- Стоп-розчин (1 флакон) 15 мл
Сірчана кислота 0.15 моль/л
- Контроль DHEA-S (1 пляшка) 1мл

Концентрація Контролю є специфічною для партії і вказується в сертифікаті аналізу

Необхідні матеріали, що не входять до набору
Дистильована вода.

Допоміжні матеріали та прилади

- Автоматичний диспенсер.
- Мікропланшетний зчитувач (450 нм).

Примітки

Зберігати всі реагенти при 2- 8 °С в темноті.
Відкрити Реагент 3 (антитіло) тільки тоді, коли воно при кімнатній температурі і закрити відразу після використання. Не видаляти плівку на невикористаних смужках.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Реагент містить Проклін 300 в якості консерванту.
- Всі реагенти повинні зберігатися в холодильнику при температурі 2-8 °С в оригінальній упаковці. Усі винятки чітко вказано. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при зберіганні і використанні, як зазначено.
- Дозволити всім компонентам набору та зразкам досягти кімнатної температури (22-28 °С) і добре перемішати перед використанням.
- Уникати впливу на реагент ТМБ/H₂O₂ прямого сонячного світла, металів або окислювачів.
- Дотримуватись максимальної точності при приготуванні та внесенні реагентів.
- Не використовувати реагенти з різних партій.
- Цей метод дозволяє визначити DHEA-S від 0.1 мкг/мл до 10 мкг/мл.
- Клінічне значення визначення DHEA-S може бути недейсним, якщо пацієнт вживав кортизон або натуральні чи синтетичні стероїди.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Підготовка Стандарту (S₀...S₅)

Стандарти мають наступні концентрації DHEA-S:

нг/мл	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
	0	2	8	20	80	200

Стабільність: до закінчення терміну придатності, зазначеного на упаковці.

Концентрація Стандарту в 50 разів нижче, ніж значення, вказані в контрольному діапазоні, тому, що в цьому аналізі зразки розводили 1/50, в той час як стандарти не розводили. Концентрації, які необхідно ввести для розрахунків:

мкг/мл	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
	0	0.1	0.4	1.0	4.0	10.0

Після відкриття стандарти є стабільними на протязі 6 місяців при +4 °С.

2. Підготовка розчинника сироватки

Розвести вміст 5X Концентрату Розчинника Сироватки до 100 мл дистильованою водою в підходящій для зберігання ємності. Зберігати при 2-8 °С до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

3. Підготовка взірця

Визначення Дегідроепіандростерон сульфату може бути виконано як в плазмі, так і в сироватці хворих, які спостерігалися натще. Зберігати зразки при -20 °С, якщо визначення не виконується в той же день.

Безпосередньо перед використанням розбавити кожен зразок 1:50 розведеним Розчинником для сироватки (наприклад, додати до 980 мкл розведеного Розчинника 20 мкл зразка). Добре перемішати. Контроль готовий до використання.

ПРОЦЕДУРА

Оскільки необхідно виконати визначення у двох примірниках, підготувати дві лунки для кожної з п'яти точок стандартної кривої (S₀-S₅), дві для кожного зразка, одну для Бланка.

Реагент	Стандарт	Взірець	Бланк
Стандарт S ₀ -S ₅	30 мкл		
Розведений Візірець/ Контроль		30 мкл	
Кон'югат	100 мкл	100 мкл	
Інкубувати на протязі 60 хвилин при 37 °С. Видалити вміст кожної лунки, промити лунки з 300 мкл дистильованої води. Повторити процедуру промивки з повним			

зливанням води.			
Субстрат ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати на протязі 15 хвилин при КТ (22-28 °С) в темноті.			
Стоп Розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Зчитати щільність (Е) при 450 нм в порівнянні з Бланком.			

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю при нормальних, високих і низьких рівнях DHEA-S для моніторингу проведення тесту. Ці контролю повинні розглядатися як невідомі і визначати значення для них в кожній процедурі тесту. Графіки контролю якості повинні бути збережені для аналізу характеристик реагентів. Відповідні статистичні методи варто використовувати для з'ясування тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити межі аналізу. Інші параметри, які повинні бути перевірені, включають 80, 50 і 20% перетину стандартної кривої для визначення відтворюваності. Крім того, максимальне поглинання має узгоджуватися з минулим досвідом. Значне відхилення від показників вказує на непомічену зміну в умовах або деградацію реагентів в наборі. Свіжі реагенти повинні бути використані, щоб визначити причину відхилень.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Проведення тесту

Зразки, забруднені мікробіологічно, не повинні використовуватися в аналізі. Високо ліпемічні або гемолізовані зразки також не повинні використовуватися. Важливо, щоб час реакції для кожної лунки був стабільним для відтворюваних результатів. Піпетування проб не повинно займати більше десяти хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту. Якщо використовується більше одного планшета, рекомендується будувати додаткову калібрувальну криву. Додавання розчину субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в тій же послідовності, щоб усунути будь-які відхилення часу в ході реакції. Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунки. Недотримання видалення розчину на етапі аспірації або декантування може призвести до неточних результатів.

2. Інтерпретація

Якщо комп'ютерні програми використовуються для розрахунку результатів тесту, потрібно, щоб прогнозовані значення калібраторів опинялися в межах 10% від відповідних концентрацій.

РЕЗУЛЬТАТИ

1. Середні значення абсорбції

Підрахувати середнє значення оптичної щільності (Em) для кожної точки калібрувальної кривої (S₀-S₅) і в кожному зразку.

2. Стандартна крива

Відкласти значення поглинання стандартів проти концентрацій. Провести оптимальну криву через точки на графіку (4-параметровий Логістичний метод). Концентрації, який необхідно ввести:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
мкг/мл	0	0.1	0.4	1.0	4.0	10.0

3. Підрахунок результатів

Провести інтерполяцію значень зразків на стандартну криву для отримання відповідних значень концентрацій, виражених в мкг/мл.

КОНТРОЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Контрольні значення Сироватки або плазми Дегідроепіандростерон сульфату:

	Жінки мкг/мл	Чоловіки мкг/мл
Новонароджені	0.9 – 1.8	0.9 – 1.8
До статевого дозрівання	0.25 – 1.0	0.25 – 1.0
Дорослі	0.9 – 3.6	0.9 – 3.6
Після менопаузи	< 0.25 – 1.0	
Вагітність	0.25 – 1.8	

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

1. Варіація в аналізі

Точність в аналізі визначається повторними визначеннями чотирьох різних контрольних сироваток в одному аналізі. І складає < 5.7%.

2. Варіація між аналізами

Точність між аналізами визначалася повторним (16х) вимірюванням різних контрольних сироваток в 2 різних лотах. І складає < 9.6%.

3. Точність

Відновлення при додаванні до зразка 5 – 2.5 – 1.25 – 0.6 мкг/мл DHEA-S дало середнє значення (± стандартне відхилення) 96.71% ± 12.02% по відношенню до початкової концентрації. Розведення, виконані на трьох сироватках 2 - 4 - 8 разів, дали середнє значення (±SD) 98.19% ± 5.70 %.

4. Специфічність

Перехресна реакція антитіл, підрахована при 50% відповідно до Abraham, наведена в таблиці:

DHEA-S	90
DHEA	100.0
Androsterone-S-Na	48
Androstenedione	20
Etiocolanone-S-Na	0.2
5-Androstendione	0.01
Testosterone	0.01
Progesterone	0.01
17 OH Progesterone	0.01
Estrone	0.01
Cortisol	0.001
Colesterolo	0.001

5. Чутливість

Найнижча концентрація DHEA-S, що визначається, і яку можна відрізнити від нульового стандарту, становить 0.03 мкг/мл при 95% довірчому інтервалі.

6. Кореляція з RIA

Набір DHEA-S ІФА був порівняний з іншим комерційно доступним DHEA-S аналізом. Зразки сироватки 29 жінок і 20 чоловіків аналізували відповідно в обох тест-системах.

Лінійна крива регресії була розрахована за наступним рівнянням (DHEA-S) = 0.94 * (DHEA-S RIA) – 0.01
R² = 0.906

ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих правил.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Черновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com