

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАТУ ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОНУ (DHEA-S)

5125-300, Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEA-S) Test System

Каталог. №: 5125-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 16-07-2019

Версія 5



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

1.0 ВСТУП

Використання за призначенням: Кількісне визначення концентрації сульфату Дегідроепіандростерону в сироватці або плазмі крові за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

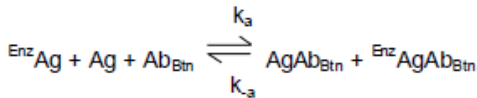
2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз - тип 7

Необхідні для ІФА реанти 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 – див. оригінал інструкції.



Ab_{Btn} = Біотинильовані 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

Стрептавідин_{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-S – 1 мл/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для DHEA-S з концентраціями 0 (А), 0.2 (В), 1.0 (С), 2.0 (D), 4.0 (E) та 8.0 (F) мкг/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містить консерванти. Концентрації стандартів можуть бути виражені в молях (нМоль/л) множенням на коефіцієнт 2.71.

Наприклад: 1 мкг/мл x 2.71 = 2.71 мкМоль/л

В. Ферментний реагент DHEA-S – 6.0 мл/флакон

Один флакон, що містить кон'югат DHEA-S (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині, з червоним барвником. Зберігати при 2-8 °С.

С. Біотиновий реагент DHEA-S – 6.0 мл

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до DHEA-S, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, блакитний барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °С.

D. 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 °С.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

I. 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 °С. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, що не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 10 та 50 мкл с точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 и 350 мкл с точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери перемінного об'єму 200-1000 мкл для розведення кон'югату
4. Мікропланшетний вошер
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм
6. Фільтрувальний папір для просушування планшета
7. Пластикові плівка чи кришка для інкубації мікропланшета
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання
9. Таймер
10. Контрольні матеріали

5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки 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, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

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

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи гепаринової плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівняності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натще. Зберіть кров в пробірки для венепункції з червоною кришечкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірку з ЕДТА або гепарином для плазми. Дозвольте крові згорнутись (для сироватки). Відцентрифугуйте зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

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 бути охолоджені до 2-8 °С на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °С до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.020 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю відповідно з низьким, нормальним і високим діапазоном для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик поставлених реагентів. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або деградацію реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розведіть вміст концентрату промивного буферу до 1000 мл дистильованою чи деіонізованою водою в придатній посудині. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °С до 60 днів.

2. Робочий розчин субстрату – стабільний протягом 1 року

Перенесіть вміст флакону "розчин А" у флакон "розчин В". Закрийте суміш жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть флакон «Робочий розчин субстрату». Розчин зберігається при 2-8 °С.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він виглядає голубим.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти та контролю повинні досягнути кімнатної температури (20-27°С).

****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 °С.
- Додайте піпеткою по 10 мкл референсного калібратора сироватки, контрольного зразка та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 50 мкл Ферментного реагенту DHEA-S у кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Додайте по 0.050 мл (50 мкл) кон'югату біотин-анти-DHEA-S в кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл буфера для промивок (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 (уникайте повітряних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити 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 СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте лунки 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 проводите при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 8.0 мкг/мл необхідно розвести в 5 або 10 разів стандартом «0» або пулованою сироваткою з відомо низькою концентрацією DHEA-S.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації DHEA-S в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації DHEA-S в мкг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
- Визначте невідомі концентрації DHEA-S у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.078 перетинає стандартну криву при 1.21 мкг/мл (див. мал.1)

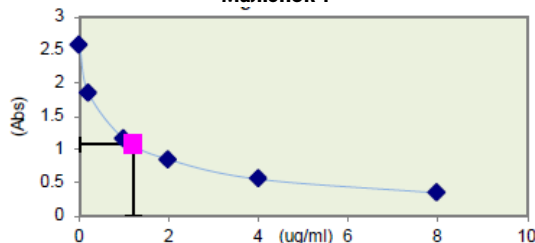
Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (мкг/мл)
Калібратор А	A1	2.562	2.572	0
	B1	2.582		
Калібратор В	C1	1.865	1.847	0.2
	D1	1.829		
Калібратор С	E1	1.186	1.163	1.0
	F1	1.140		
Калібратор D	G1	0.855	0.850	2.0
	H1	0.845		
Калібратор E	A2	0.555	0.556	4.0
	B2	0.557		
Калібратор F	C2	0.355	0.349	8.0
	D2	0.344		
Контроль 1	G2	1.394	1.387	0.62
	H2	1.380		
Пацієнт 1	A3	1.065	1.078	1.21
	B3	1.091		

* 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 вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

- Оптична густина Калібратора 0 мкг/мл повинна бути ≥ 1.8 .
- Чотири з шести контролів якості повинні вкладатися в установлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

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

12.1 Якість 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.

6. 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. Зразки з концентрацією вище 8.0 мкг/мл необхідно розвести в 5 або 10 разів, або вище, «0» калібратором DHEA-S. Помножьте зчитані дані на фактор розведення для отримання реальних концентрацій.
10. 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.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. 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.
13. 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 розраховані значення стандартів не повинні відхилятися 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 референсних інтервалів для "нормальної" дорослої популяції, очікувані значення при використанні даного методу наведені в таблиці 1:

Таблиця 1
Очікувані значення для тест-системи DHEA-S

Населення	Діапазон (мкг/мл)
Чоловіки	0.06 – 4.58
Жінки*	0.03 – 5.88

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, тестованої популяції і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору DHEA-S всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Число, значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	16	0.66	0.06	9.8%
Нормальний	16	1.14	0.05	4.9%
Високий	16	4.84	0.21	4.3%

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами (мкг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	0.61	0.06	9.5%
Нормальний	10	1.36	0.04	3.1%
Високий	10	4.73	0.16	3.4%

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.042 мкг/мл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (мкг/мл) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним хемілюмінесцентним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом DHEA-S (діапазон значень 0.2 - 7.7 мкг/мл). Загальне число зразків було 77. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	1.12	$y = 0.1448 + 0.986(x)$	0.983
Референсний	1.18		

Було знайдено лише незначне розходження даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують чудову узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин у різних концентраціях до сироваткової матриці. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність
DHEA-S	1.0000
DHEA	0.0004
Андростендіон	0.0003
Дигідротестостерон	0.0008
Кортизон	< 0.0001
Кортикостерон	< 0.0001
Кортизол	0.0004
Спіролактон	< 0.0001
Естріол	< 0.0001
Естрадіол	< 0.0001
Естрон	< 0.0001
Тестостерон	< 0.0001



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

