

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОНУ МЕТОДОМ ІФА

Dehydroepiandrosterone (DHEA) Test System

Кат. №: 7425-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 3



Основою 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 імуоферментного аналізу, колориметричного.

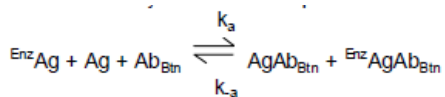
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуоферментний 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'язуючи сайтів антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Біотинильовані х-ДГЕА 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

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:

A. Калібратори ДГЕА - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсної сироватки для ДГЕА з концентраціями 0 (A), 0.5 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 10.0 (E) і 30.0 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C).

Містять консерванти. Калібратори можуть бути виражені в молярних концентраціях (нМ/л (nM/l)) шляхом множення на 3.47.

Наприклад: 1 нг/мл (ng/ml) x 3.47 = 3.47 мкМ/л (µM/l)

B. Ферментний реагент ДГЕА - 6 мл (мл)/флакон

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

C. Біотиновий Реагент ДГЕА - 6 мл (мл)/флакон

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

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

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

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

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

F. Субстратний розчин - 12 мл (мл)/флакон

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

G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

H. 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 (°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 (µl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%.
3. Дозатори регульованого об'єму (200-1000 мкл (µl)) для кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Поліетиленова плівка або кришка 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, ВГС 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.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками має бути кров; сироватка або гепаринізована плазма за типом, збір яких проводиться з урахуванням звичайних заходів обережності для збору проб венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). 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 (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натщесерце.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) 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 (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

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

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°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 (°C).
- Додайте піпеткою по 25 мкл (μl) референсного калібратора сироватки, контрольного зразка та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 50 мкл (μl) Ферментного реагенту ДГЕА у кожну лунку.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Біотинового Реагенту анти-ДГЕА 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 (μl) 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 пляшка під тиском, наповніть кожну лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожну 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 кожну лунку 50 мкл (μl) 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 (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Розвести зразки, концентрація яких, можливо, вище 30 нг/мл (ng/ml) 1: 5 з «0» нг/мл (ng/ml) калібратором ДГЕА.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ДГЕА 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 кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації ДГЕА в мкг/мл (μg/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації ДГЕА 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 (ng/ml) (див. мал.1)

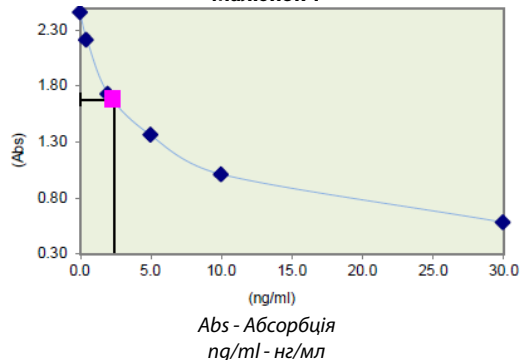
Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
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 Е	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 (μg/ml) 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.

4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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 невідтворених 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 - відповідно до вимог Директиви 98/79/EC IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою за Monobind@monobind.com.

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® ІФА 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 відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. **Клінічно значення ДГЕА-С 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® ІФА ДГЕА докладно описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для системи ДГЕА AccuBind® ІФА
нг/мл (ng/ml)

Чоловіки	1.8-12.5
Жінки	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 ДГЕА 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 (ng/ml))

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 (ng/ml))

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 (ng/ml) для даного набору.

14.3 Специфічність

% перехресної реактивності антитіл ДГЕА 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 ДГЕА, необхідної для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

Речовина	Перехресна реактивність
ДГЕА	100.000
ДГЕА-С	0.004
Андростенедіон	0.056
Кортикостерон	0.004
Кортизол	0.001
Прегненолон	0.070
Тестостерон	0.002
Дигідротестостерон	0.007
Естріол	< 0.001
Естрадіол	< 0.001
Естрон	< 0.001



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поїнт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

