

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ДГЕА-С (ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОН СУЛЬФАТ) ELISA

DHEA-S ELISA

Каталог. №: **EIA-1562**
Кількість: **96**

Дата випуску інструкції: **07-2014**
Версія **7.0**



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

1. ВСТУП

1.1 Призначення

DRG DHEA-S ІФА – імуоферментний аналіз для кількісного діагностичного *in Vitro* визначення ДГЕА-С у сироватці та плазмі.

1.2 Короткий опис та пояснення

Дегідроепіандростерон (5-Андростерон-3 β -0L-17-один, Андростенолон, Дегідроізоандростерон, Трансдегідроандростерон, DHEA) – це стероїдний гормон, який присутній у крові, в більшості у її сульфатній формі (DHEA-S). DHEA-S – це більш специфічним продуктом наднирників і вимірювання цього стероїду широко використовуються у клінічній практиці. Медичне значення тестування плазми DHEA-S пов'язане з діагностикою гіперплазії наднирників та диференціальної діагностики гірсутизму(1).

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір DRG ДГЕА-С ELISA базується на принципі конкурентного зв'язування.

Мікротитрові лунки покриті поліклональним антитілом, спрямованим до антигенної сторони молекули ДГЕА-С.

Ендогенний ДГЕА-С зразка пацієнта конкурує з кон'югантом ДГЕА-С, пероксидази для зв'язування з покритим антитілом. Після інкубації незв'язаний кон'югант вимивається.

Кількість зв'язаного кон'юганта пероксидази обернено пропорційна до концентрації ДГЕА-С у зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність утвореного кольору. Обернено пропорційна концентрації ДГЕА-С у зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Для діагностики *in vitro*. Для професійного використання.
- Всі реактиви цього тест-набору, що містять людську сироватку або плазму, були протестовані та підтвержені негативними на ВІЛ-інфекції I/II, HBsAg та HCV, та затверджені FDA. Проте всі реактиви, слід розглядати як потенційні біологічні небезпеки у використанні та утилізації.
- Перед початком аналізу, повністю та уважно ознайомтесь з інструкцією. Використовуйте дійсну версію інструкції з використання, яка постачається у наборі. Переконайтесь, що все зрозуміло.
- Мікропланшет містить відрізи смужки. Невикористані лунки потрібно зберігати при температурі від 2°C до 8 °C у герметичній упаковці і використати до зазначених термінів.
- Піпетування зразків та реагентів повинно бути здійснено якомога швидше і в тій же послідовності для кожного етапу.
- Використовуйте резервуари тільки для одних реагентів. Це особливо стосується резервуарів із субстратом. Використовуючи резервуар для розчину субстрату, в якому до того зберігався розчин кон'юганту, розчин може отримати забарвлення.
- Ретельно перемішайте вміст мікропланшетних лунок, щоб отримати добрі результати тесту. Не використовуйте мікролунки повторно.
- Не допускайте висихання лунок під час аналізу; додайте реактиви одразу після процедури промивання.
- Дозвольте реагентам досягнути кімнатної температури (21-26°C) перед початком температури. Температура вплине на показники абсорбції аналізу. Однак, це не впливає на значення зразків пацієнта.
- Не піпетуйте ротом та уникайте контакту реагентів та зразків зі шкірою та слизовими оболонками.
- Не куріть, не їжте, не пийте та не робіть макіяж в місцях обробки зразків та реагентів з набору.
- Одягайте одноразові латексні рукавиці під час обробки зразків та реагентів. Мікробне забруднення реагентів або зразків може дати неправильні результату.

- Обробку слід здійснювати у відповідності з процедурами, визначеними належними національними правилами щодо біологічної безпеки.
- Не використовуйте реактиви після закінчення терміну придатності, вказаного на етикетках наборів.
- Всі визначені обсяги повинні виконуватися відповідно до протоколу. Оптимальні результати тесту можна отримати тільки тоді, коли використовувати калібрувальні піпетки та зчитувачі мікротитрових планшетів.
- Не змішуйте та не використовуйте компоненти з наборів з різними номерами лотів. Не рекомендується замінювати лунки різних планшетів навіть одного лоту. Набори можуть транспортуватися та зберігатися за різних умов та характеристики зв'язування планшетів можуть дещо відрізнятися.
- Уникайте контакту зі *Стоп Розчином*, який містить 0.5 М H₂SO₄. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки.
- Деякі реактиви містять Проклін 300, BND і/або MIT як консервант. У випадку попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
- ТМВ субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизову. У разі можливого контакту, промийте очі з великою кількістю води, а шкіру - водою з милом. Промийте забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні, виведіть людину на відкрите повітря.
- Хімічні речовини та готові або використані реактиви повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національних правил біологічної безпеки.
- Для отримання інформації про небезпечні речовини, які входять до складу набору, зверніться до Паспорту безпеки. Паспорт безпеки для цього продукту доступний за запитом безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Надані реактиви

- Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (роздільні), 96 лунок; Лунки покриті антитілом анти-ДГЕА-С (поліклональним).
- Стандарт (стандарту 0-6)**, 7 фл., 1 мл, готові до використання; Концентрації: 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 мкг/мл. Конверсія: 1 мкг/мл = 2.6 мкмоль/л. Не містить ртутний консервант.
- Ферментний кон'югант**, 1 фл., 25 мл, готовий до використання, DHEA-S, кон'югований з пероксидазою; Не містить ртутний консервант.
- Розчин субстрату**, 1 фл., 14 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМВ).
- Стоп розчин** 1 фл., 14 мл, готовий до використання, Містить 0.5M H₂SO₄. Уникайте контакту зі *стоп розчином*. Він може спричинити подразнення шкіри та опіки.
- Розчин для промивання**, 1 фл., 30 мл (40X концентрований), Див. «Підготовка реагентів».

Примітка: Додатковий "0" стандарт для розведення доступний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, які не постачаються

- Мікротитровий планшетний калібрований зчитувач (450 нм \pm 10 нм)(напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Калібрувальні змінні прецензійні мікропіпетки.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Напівлогарифмічний графічний папір або програмне забезпечення для зменшення даних

4.2 Умови зберігання

При температурі 2-8 °C, непошкоджені реактиви будуть зберігатися свою реактивність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реактиви після закінчення терміну придатності. Відкриті реактиви потрібно зберігати при 2-8 °C. Мікротитрові лунки необхідно зберігати при 2-8 °C. Після того як упаковку було відкрито, знову закрийте її щільно. Відкриті набори зберігають активність протягом двох місяців, якщо їх зберігати як описано вище.

4.3 Підготовка реагентів

Доведіть усі реактиви та необхідну кількість смужок, які будуть використовуватися, до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40x концентрованого промивного розчину.

Розведіть 30 мл концентрованого *Промивного розчину* 1170 мл деіонізованої води, щоб в кінці отримати об'єм 1200 мл. Розведений промивний розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.4 Утилізація набору

Утилізацію набору потрібно здійснювати відповідно до національних вимог. Спеціальна інформація для даного продукту вказана у Паспорті безпеки матеріалів.

4.5 Пошкоджені тестові набори

При серйозному пошкодженні наборів або його компонентів, необхідно повідомити DRG у письмовій формі, протягом 1 тижня після отримання набору. Пошкоджені компоненти не можна використовувати в аналізі. Їх необхідно зберігати до остаточного рішення. Після цього, їх слід утилізувати відповідно до офіційних правил.

5. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

В даному аналізі можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА-, гепаринову або цитратну плазму).

Не використовуйте гемолітичні, жовтяні або ліпемічні зразки.

Примітка: Зразки, які містять азид натрію, не рекомендується використовувати в аналізі.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Зробіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дайте можливість згуститися та відділіть сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугуйте, якщо не відбулося повне згортання. Для пацієнтів, які проходять антикоагулянтну терапію, збільшується час згортання.

Плазма:

Цільну кров потрібно зібрати у центрифужні пробірки, які містять антикоагулянт (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідною підготовкою плазми) та центрифугувати відразу після забору.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закритими і зберігатися до 5 днів при температурі 2-8 °C перед тестуванням.

Для більш довготривалого періоду зберігання, зразки потрібно заморозити до -20 °C і зберігати до проведення аналізу. Розморожені зразки потрібно перевірити кілька разів перед тестуванням.

5.3 Розведення зразка

Зразки з початковими значеннями вищими ніж найвищий стандарт, необхідно розбавити стандартом 0 та повторно проаналізувати як описано вище.

Для обчислення концентрації, потрібно врахувати цей фактор розведення.

Наприклад:

- розведення 1:10: 10 мкл сироваток + 90 мкл 0 стандарт (ретельно перемішайте);
- розведення 1:100: 10 мкл розведення 1:10 + 90 мкл 0 стандарт (ретельно перемішайте)

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Перед використанням доведіть всі реагенти та зразки до кімнатної температури. Ретельно перемішайте всі реагенти, не утворюючи піни.
- Тест потрібно виконувати без перерви.
- Кожного разу використовуйте одноразові пластикові наконечники для піпеток для кожного стандарту, зразка і контролю, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція – це функція часу та температури інкубації. Рекомендується, щоб перед початком аналізу всі реагенти були готові, кришечки зняті, всі необхідні лунки закріплені у тримачі і т. д. Це забезпечить рівний проміжок часу для етапу піпетування без перерви.
- В основному, ферментна реакція лінійно пропорційна часу та температурі.

6.2 Процедура тестування

Кожний запуск повинен включати в себе стандартну криву.

- Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у тримач рамки.
- Внесіть **25 мкл** кожного **стандарту, контролю і зразків**, використовуючи нові одноразові наконечники, у відповідні лунки.
- Додайте **200 мкл ферментного кон'юганту** у кожен лунку.

Ретельно перемішуйте протягом 10 сек. Дуже важливо на цьому етапі досягнути повного змішування.

- Інкубуйте протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
- Витрусіть вміст лунок.

Промийте лунки **3 рази** (400 мкл на лунку) розведеним *Промивним розчином*. Різно витрусіть лунки над абсорбуючим папером, щоб видалити залишки вологи.

Важлива примітка:

Чутливість та точність аналізу залежить від правильного виконання процедури промивання!

- Додайте **100 мкл Розчину субстрату** у кожен лунку.
- Інкубуйте протягом **15 хвилин** при кімнатній температурі.
- Зупиніть ферментну реакцію, додавши **50 мкл Стоп розчину** у кожен лунку.
- Визначіть оптичну щільність кожної лунки при **450 нм ± 10 нм** мікротитровим планшетним зчитувачем.
- Рекомендується, щоб лунки були зчитані протягом **10 хвилин** після додавання *Стоп розчину*.

6.3 Обчислення результатів

- Обчисліть значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнта.
- Використовуючи напівлогарифмічний графічний папір, побудуйте стандартну криву використовуючи середню абсорбцію отриману з кожного стандарту до їх концентрації зі значенням абсорбції на вертикальній осі (Y) та концентрації на горизонтальній осі (X).
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначіть відповідну концентрацію на стандартній кривій.
- Автоматичний метод: результати в інструкціях з використання були обчислені автоматично, з використанням 4-Параметрової придатної кривої. (4 Parameter Rodbard або 4 Parameter Marquardt є переважними методами.) Інші функції зменшення даних можуть давати дещо інші результати.
- Концентрації зразків можна зчитати прямо з цієї стандартної кривої. Зразки з концентраціями вищими ніж у найвищому стандарті повинні бути додатково розведені або повідомлені так > 10 мкг/мл. При розрахунку цих концентрацій потрібно врахувати фактор розведення.

6.3.1 Зразок типової стандартної кривої:

Стандарт	Оптичні одиниці
Стандарт 0 (0 мкг/мл)	1.69
Стандарт 1 (0.1 мкг/мл)	1.35
Стандарт 2 (0.5 мкг/мл)	0.93
Стандарт 3 (1.0 мкг/мл)	0.67
Стандарт 4 (2.5 мкг/мл)	0.46
Стандарт 5 (5.0 мкг/мл)	0.33
Стандарт 6 (10.0 мкг/мл)	0.23

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свої нормальні та патологічні значення.

У дослідженні здорових дорослих використовували DRG ДГЕА-С ELISA і отримали наступні результати:

Чоловік:	<50 років	0.59 – 2.96 мкг/мл
	>50 років	середнє: 1.01 мкг/мл
Жінка:	<50 років	0.40 – 2.17 мкг/мл
	>50 років	середнє: 0.63 мкг/мл

Самі результати не можуть бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Їх потрібно співвідносити з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Добра лабораторна практика вимагає проводити перевірку кожної калібрувальної кривої. Для визначення середніх значень та прийнятних діапазонів для забезпечення належної роботи, необхідно провести аналіз статистично значущої кількості контролів. Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних та федеральних правил. Щоб гарантувати щоденну дійсність результатів, рекомендується використовувати контрольні зразки. Використовуйте контролю як на звичайному, так і на патологічному рівні.

Контролі та відповідні результати QC-лабораторії вказані у сертифікаті КЯ, входять до набору.

Значення та діапазони, вказані у листі КЯ, завжди відносяться до поточного лоту наборів і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів. Для забезпечення точності результатів також

рекомендується використовувати національну або міжнародну програми оцінки якості.

Використовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень та тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим прийнятним діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнта слід вважати недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні напрями: пристрої піпетування та синхронізації; фотометр, термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, методи аспірації та промивання. Після перевірки вищезгаданих елементів, не знайшовши помилки, зв'яжіться безпосередньо з дистриб'ютором або DRG.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0-10 мкг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були перевірені на перехресну реактивність:

Стероїд	% перехресної реакції
ДГЕА-С	100
Андростенедіон	20,9
Андростерон	8,5
Андростерон-сульфат	< 0.1
Прогестерон	4,7
Тестостерон	0,3
Естрон	0,9
Естріол	< 0.1
17-β-Естрадіол	< 0.1
Естрадіол Сульфат	< 0.1
Кортизол	< 0.1

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість DRG ELISA була розрахована шляхом віднімання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 реплікативних аналізів стандарту 0 і було встановлено, що вона становить 0,044 мкг / мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність всередині аналізу

Зразок	К-сть	Середнє, мкг/мл	КВ %
1	20	0.2	4.6
2	20	1.3	5.1
3	20	4.2	4.7

9.4.2 Варіативність між аналізами

Зразок	Середнє, мкг/мл	КВ %
1	0.2	6.5
2	1.3	10.6
3	4.4	5.4

9.5 Відновлення

Зразки були збільшені шляхом додавання розчинів ДГЕА-С з відомими концентраціями у співвідношенні 1: 1.

% відновлення був розрахований множенням співвідношення вимірювань та очікуваних значень на 100 (очікуване значення = (ендогенний ДГЕА-С + доданий ДГЕА-С)/2; через розведення сироватки 1: 2 шипованим матеріалом).

Сироватка	Дод. концентрація 1:1 (v/v) (мкг/мл)	Виміряна конц. мкг/мл	Очікувана конц. мкг/мл	Відтворюваність %
1	-	0.2	0.20	100
	1.0	0.7	0.60	109
	2.5	1.4	1.35	106
	5.0	2.8	2.60	108
2	-	1.1	1.10	100
	1.0	1.1	1.05	101
	2.5	2.1	1.80	114
	5.0	3.4	3.05	110
3	-	3.8	3.80	100
	2.5	2.8	3.15	91
	5.0	4.3	4.40	97
	10.0	7.0	6.90	102

9.6 Лінійність

Сироватка	Фактор розведення	Серед. конц., мкг/мл	Відтворюваність (%)
1	нерозведений	4.825	—
	1:2	2.505	104
	1:4	1.191	99
	1:8	0.644	107
	1:16	0.320	106
2	нерозведений	1.147	—
	1:2	0.620	108
	1:4	0.310	108
	1:8	0.153	107
	1:16	0.078	109
3	нерозведений	4.200	—
	1:2	2.116	101
	1:4	1.024	98
	1:8	0.486	93
	1:16	0.264	101

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним ознайомленням із інструкцією та дотримання належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація цього випробування може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) та тригліцериди (до 7,5 мг/мл) не впливають на результати аналізу.

10.2 Інтерференція препаратів

На сьогоднішній день нема речовин, які впливають на вимірювання ДНЕА-С у зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

В даному аналізі відсутній «Хук-ефект».

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Тест повинен бути виконаний відповідно до інструкцій з використання. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (Good Laboratory Practice) або інших національних стандартів та / або законів, які застосовуються. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди долучати в процедуру випробувань достатню кількість контролів для перевірки точності та точності випробування. Результати випробувань є дійсними лише в тому випадку, якщо всі елементи керування знаходяться в межах зазначеного діапазону, і якщо всі інші параметри тесту також відповідають специфікаціям аналізу. У разі будь-якого сумніву або стурбованості звертайтеся до DRG.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки ніколи не повинні ґрунтуватися на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати випробувань узгоджуються з предметами, зазначеними в пункті 11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Лише в тих випадках, коли лабораторні результати є прийнятною згодою із загальною клінічною картиною пацієнта, слід отримати терапевтичні висновки.

Сам результат тестування ніколи не повинен бути єдиним детермінантом для виявлення будь-яких терапевтичних наслідків.

11.3 Відповідальність

Будь-яка модифікація тест-набору та / або обмін або суміш будь-яких компонентів різних лотів з одного тест-набору на інший, може негативно вплинути на очікувані результати та обґрунтованість загального тесту. Такі модифікації та / або обміни анулюють будь-яких вимоги на заміну.

Претензії, подані у зв'язку з неправильним розумінням клієнта результатів лабораторних випробувань, вказані в пункті 11.2. також недійсні. Незважаючи на це, у разі будь-якої претензії, відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Будь-який пошкодження, нанесені тестовому набору під час транспортування, не підлягають відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drg@drq-diagnostics.de)



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

