

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ДГЕА (ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОН-СУЛЬФАТ) ELISA

DHEA ELISA

Каталог. №: **EIA-3415**

Дата випуску інструкції: **2014/12**

Версія **4.0**



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

1 ВСТУП

Застосування

Цей набір є імуноферментним аналізом для кількісного діагностичного визначення *in vitro* пов'язаного з вагітністю плазма протеїну А (PAPP-A) в сироватці та плазмі.

Короткий опис (див. Оригінал інструкції).

2 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Даний набір є імуноферментним аналізом твердої фази (ELISA), заснований на принципі конкурентного зв'язування.

Мікротитрові лунки покриті поліклональними антитілами, спрямованими проти антигенного сайту на молекулі DHEA. Ендогенний DHEA зразка пацієнта конкурує з кон'югатом пероксидази хрому-DHEA за зв'язування з покриттям антитіла. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається. Кількість пов'язаного кон'югату пероксидази обернено пропорційна концентрації DHEA в зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність отриманого кольору є обернено пропорційна концентрації DHEA в зразку пацієнта.

3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання **in-Vitro**.
2. Перед початком аналізу повністю і уважно прочитати інструкцію. Використовувати тільки дійсну версію інструкції. Впевнитись, що все зрозуміло.
3. Всі реагенти цього набору, які містять людську сироватку або плазму, тестувалися і підтверджені FDA методиками як негативні до ВІЛ-1,2, поверхневого антигену гепатиту В і вірусу гепатиту С. Однак, під час використання та знищення всі реагенти слід розглядати як потенційно біологічно небезпечні.
4. Уникайте контакту зі стоп розчином, що містить 0.2 моль/л H₂SO₄. Він може викликати подразнення шкіри і опіки.
5. Субстрат ТМБ має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У разі контакту промити очі з великою кількістю води, а шкіру з милом та великою кількістю води. Промити забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні вийти на свіже повітря.
6. Мікропланшет складається зі смужок, які відриваються. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °C в закритому пакеті і використовувати з рамкою, що надається.
7. Піпетування зразків та реагентів проводити якомога швидше і в однаковому порядку для кожного кроку.
8. Використовувати ємності тільки для одиночних реагентів. Це особливо стосується ємностей з субстратами. Використання пробірки для розчину субстрату, яка перед тим використовувалась для розчину кон'югату, може призвести до зміни кольору субстратного розчину. Не зливати реагенти назад у ємності, це може призвести до забруднення реагентів.
9. Перемішувати вміст лунок ретельно для отримання надійних результатів. Не використовувати лунки повторно.
10. Не дозволяти лункам висихати під час проведення аналізу; додавати реагенти одразу ж після завершення кроків промивки.
11. Дозволити реагентам нагрітись до кімнатної температури (21-26 °C) перед початком аналізу. Температура впливає на результати зчитування. Але не впливає на значення зразків пацієнтів.
12. Ніколи не піпетувати ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою та слизовими оболонками.
13. Не палити, не вживати їжу, не пити і не наносити косметику на територію, де обробляються зразки або реагенти набору.
14. Одягайте одноразові рукавички з латексу при обробці зразків і реагентів. Мікробіологічне зараження реагентів або зразків може дати помилкові результати.

15. Проведення аналізу має відповідати процедурам, зазначеним у відповідних державних посібниках або правилах з біологічної безпеки.
16. Не використовуйте реагенти після дати закінчення терміну придатності, яка вказана на етикетках набору.
17. Згідно з протоколом аналізу необхідно слідувати всім робочим обсягам реагентів.
18. Використання каліброваних піпеток та зчитувальних пристроїв мікротитрових планшетів. Оптимальні результати аналізу можна отримати тільки при використанні відкаліброваних дозаторів та мікротитрових планшетних зчитувачів.
19. Не змішуйте і не використовуйте компоненти наборів з різними номерами партій. Рекомендується не замінювати лунки різних планшетів, навіть однієї і тієї ж партії. Можливо, що набори поставлялися і зберігалися в різних умовах, і зв'язуючі якості планшетів можуть в деякій мірі відрізнятись.
20. Виходячи з відповідних державних посібників чи правил з біологічної безпеки, хімічні речовини, і підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи.
21. За інформацією щодо небезпечних речовин, що входять в набір, прохання звертатися до Специфікації Безпеки Матеріалу. Специфікації Безпеки Матеріалу надаються за запитом безпосередньо від компанії DRG Instruments GmbH.

4 РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 стрічок по 8 лунок, покритих поліклональними анти-DHEA антитілами.
2. **Стандарт (Стандарт 0-5)**, 6 флаконів, 1 мл, готові до використання;
Концентрації: 0; 0.37; 1.1; 3.30; 10.0 і 30.0 нг/мл.
Конверсія нг/мл x 3.467 = нмоль/л
Стандарти калібровані проти наступного сертифікованого референтного матеріалу: D-063 (Cerilliant);
Містить безртутний консервант.
3. **Контролі (низький і високий)**, 2 флакони, 1 мл, готові до використання,
Значення і діапазони дивіться на етикетці флакона або в паспорті якості.
Містить безртутний консервант.
4. **Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання;
DHEA кон'югований з пероксидазою хрому;
Містить безртутний консервант.
5. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання;
Тетраметилбензидин (ТМБ).
6. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання;
містить 0.5M H₂SO₄
Уникати контакту зі стоп-розчином. Він може викликати подразнення шкіри та опіки.
7. **Промивний розчин**, 1 флакон, 30 мл, Х40 концентрований.

Примітка: Додатково *Нульовий Стандарт* для розведення зразків наявний на запит.

4.2 Матеріали, що не постачаються з набором, але є необхідними

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450 нм ±10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована вода.
- Таймер.
- Міліметровий папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °C активність не розкритих реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати. Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °C. мікропланшетні лунки повинні зберігатись при 2-8 °C. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний протягом двох місяців при зберіганні, як зазначено вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стріпів до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40x концентрованого Промивного Розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного Розчину з 1170 мл деіонізованої води до об'єму 1200 мл.
Розведений Промивний Розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.

4.5 Утилізація набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкоджені набори

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма (гепаринова або цитратна) може бути використані в аналізі.

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

Увага: зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

5.1 Забір зразка

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (наприклад, Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дозволяйте їй звернутись і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

Плазма:

Цільна кров забирається в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт, і негайно центрифугується.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8 °C до 5 днів перед аналізом.

Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20 °C. Після відтавання зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок сироватки показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені 0 Стандартом і проаналізовані повторно.

Для вирахування концентрацій необхідно брати до уваги коефіцієнт розведення.

Приклад:

- Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл *Стандарт 0* (ретельно змішайте)
- Розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл *Стандарту 0* (ретельно змішайте).

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура дослідження

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативи.
2. Додайте по **10 мкл** кожного **Стандарту/Контролю/Зразка** у відповідні лунки кожен раз з новим наконечником.
3. Додайте по **100 мкл Ферментного Кон'югату** в кожну лунку. Ретельно перемішуйте впродовж 10 секунд. На цьому етапі важливо провести повне змішування.
4. Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Вилийте вміст лунок.
Промийте лунки **4 рази** розведеним *Промивним Розчином* (400 мкл на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильності проведення процедури промивання!

6. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожну лунку.
7. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку.
9. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10 нм** за допомогою мікротитрового планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання *Стоп-Розчину*.

6.3 Розрахунок результатів

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-осі проти відповідних концентрацій на Х-осі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж максимальний стандарт, необхідно ще розбавити або позначити концентрацію як > 30 нг/мл. При вирахуванні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
<i>Стандарт 0</i> (0.0 нг/мл)	2.18
<i>Стандарт 1</i> (0.37 нг/мл)	1.53
<i>Стандарт 2</i> (1.10 нг/мл)	1.05
<i>Стандарт 3</i> (3.30 нг/мл)	0.62
<i>Стандарт 4</i> (10.0 нг/мл)	0.33
<i>Стандарт 5</i> (30.0 нг/мл)	0.18

7 ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

У дослідженні, проведеному з очевидно нормальними здоровими дорослими пацієнтами, використовуючи DRG ДГЕА ELISA, спостерігаються такі значення:

Популяція	К-сть	Середнє (нг/мл)	Медіана (нг/мл)	5-ий перцентиль (нг/мл)	95-ий перцентиль (нг/мл)
Чоловіки	40	4.99	4.14	1.28	9.21
Жінки	40	2.73	1.84	0.24	6.56

Терапевтичні висновки ніколи не повинні бути засновані тільки на результатах лабораторних аналізів. Будь-який лабораторний результат є тільки частиною загальної клінічної картини пацієнта.

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно державним і федеральним правилам. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.07 – 30 нг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були перевірені на перехресну реактивність в аналізі:

	Стероїд	% перехресної реактивності
ДГЕА		100
17-ОН Прогестерон		0.03

Альдостерон	2.00
Андростенедіон	0.17
Кортизол	0.001
ДГЕА-С	0.014
Естрадіол	< 0.0001
Естріол	0.008
Естрон	1.10
Прогестерон	0.008
Тестостерон	0.013

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість визначена як середнє за мінусом 2 стандартних відхилень (20 реплік) аналізу Стандарту 0 і склала 0.07 нг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність в аналізі

Зразок	К-сть	Середнє нг/мл	КВ %
1	20	0.67	3.52
2	20	2.76	3.34
3	20	4.12	2.64

9.4.2 Варіативність між аналізами

Зразок	К-сть	Середнє нг/мл	КВ %
1	40	1.22	11.85
2	40	7.07	14.97
3	40	8.24	12.59

9.5 Відновлення

Зразки сироватки були посилені додаванням ДГЕА з відомою концентрацією в пропорції 1:1. Відсоток відновлення було отримано множенням співвідношення вимірних значень до очікуваних на 100. (Очікуване значення = (Ендогенний ДГЕА + доданий ДГЕА)/2; розведення 1:2 сироватки з матричним матеріалом).

(Табличку див. в оригіналі інструкції).

9.6 Лінійність

(Табличку див. в оригіналі інструкції).

10 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання ДНЕА в зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні.

11 ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта. Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@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

