



**Набор ИФА
для количественного определения в
сыворотке или плазме человека
ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОН-СУЛЬФАТА
(ДГЭА-С)**

Кат. № : KS19EW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 10-2003

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
(См. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор основан на конкурирующем методе иммуноферментного анализа (ИФА), где лунки покрыты специфическими антителами к ДГЭА-С. В течение первой инкубации лбразец/калибратор ДГЭА-С в образце конкурирует с ДГЭА-С, конъюгированным пероксидазой хрена (конъюгатом) за определенные зоны антисыворотки, нанесенной на лунки. После инкубации весь свободный материал удаляется циклом аспирации и промывания. Ферментная активность будет обратно пропорциональной концентрации ДГЭА-С в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМБ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм и 405 нм.

РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона

- 1. Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (кроличим) к ДГЭА-С. Хранить неиспользуемые лунки в прилагаемом полиэтиленовом пакете тщательно закрытыми.
- 2. Калибраторы:** 6 флаконов ДГЭА-С с PBS, BSA и стабилизаторами, лиофилизированные следующих концентраций: 0, 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 мкг/мл. Консервант: неомицин. Готовы к использованию. Растворить калибраторы 1 мл дистиллированной H₂O. После растворения хранить при 2-8°C 7-10 дней; при более длительном хранении заморозить при -20°C.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- 3. Ферментный конъюгат:** 1 флакон (2,7 мл) ДГЭА-Са, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) в буфере с BSA, ANS и стабилизаторами. Консервант: неомицин. Перед использованием добавить 1,2 мл конъюгата в флакон с разбавителем конъюгата и тщательно перемешать. Хранить разбавленный конъюгат при 2-8°C на протяжении 8 недель.
- 4. Разбавитель конъюгата:** 2 флакона (12 мл) цитратного буфера и BSA. Консервант: неомицин. Готовый к использованию.
- 5. Контрольная сыворотка:** 1 флакон ДГЭА-С в основе сыворотки. Лиофилизированная. Консервант: неомицин. Растворить 1 мл дистиллированной H₂O. После растворения хранить при 2-8°C 7-10 дней; при более длительном хранении заморозить при -20°C
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- 6. Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов растворите раствор,

- поместив флакон на несколько минут в температуру 37°C. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.
- 7. Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Жидкий .
 - 8. Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готовый к использованию.
Примечание: Чтобы получить раствор субстрата смешайте равные порции хромогена и субстратного буфера, используя чистый, тщательно очищенный флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течении 1 часа после подготовки.
 - 9. Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
- Самоклеющаяся пленка для планшета.
 - Полиэтиленовый пакет.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерные колбы для разбавления реагентов.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 1200 об/мин.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Недостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей

неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.

- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая $37 \pm 2^\circ\text{C}$ может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пейте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при $2-8^\circ\text{C}$ в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы при -20°C . Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
- 1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
- 2. Раскапать в соответствующие лунки по **20 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца.
- 3. Раскапать по **200 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка.
- 4. Накрыть планшета липкой пленкой и осторожно перемешать.
- 5. Инкубировать лунки в течении **60 мин. при 37**.
- 6. Удалите липкую пленку и осторожно проведите аспирацию инкубационной смеси во всех лунках.
- 7. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 8. Раскапать во все лунки по **200 мкл** предварительного подготовленного раствора субстрата (см. раздел Реагенты).
- 9. Инкубируйте лунки в течении **15 мин. при 37°C**, избегать солнечного света.
- 10. Раскапать по **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 11. Считайте ОП желательной бихроматичным фотометром **при 450 и 405 нм** с референтной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **20 минут** после завершения анализа. В случае выхода абсорбции из диапазона считайте ее при 405 нм.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылаетесь на соответствующее руководство пользователя.

СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 в оригинале инструкции).

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при двойной длине волны: 450 и 405. Для образцов с концентрациями ДГЭА-С от 1 до 10 мкг/мл считайте при длине волны 450 нм; для образцов с уровнем ДГЭА-С ниже 1 мкг/мл, считывайте при длине волны 405 нм.

Постойте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации ДГЭА-С в мкг/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой.

ПРИМЕР РАСЧЕТА

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных данных.

Описание	Абсорбция при 450 нм	ДГЭА-С	Абсорбция при 405 нм	ДГЭА-С
Калибратор 0 мкг/мл	> 3,000		1,615	
Калибратор 0,1 мкг/мл	> 3,000		1,272	
Калибратор 0,3 мкг/мл	2,791		0,962	
Калибратор 1,0 мкг/мл	1,746		0,625	
Калибратор 3,0 мкг/мл	0,959		0,342	
Калибратор 10,0 мкг/мл	0,374		0,133	
Образец 1	> 3,000		1,299	0,09 мкг/мл
Образец 2	1,156	2,2 мкг/мл	0,412	

Значения нормы

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы.

Возраст	Пол	Женщины мкг/мл	Мужчины мкг/мл
Новорожденные		1,8 - 4,1	1,8 - 4,1
Подростки		0,1 - 0,9	0,1 - 0,9
Взрослые		1,3 - 4,1	1,3 - 4,1
беременные		0,28 - 2,0	----
> 50 лет		0,1 - 0,9	0,1 - 0,9

Критерии достоверности

Прежде чем перейти к расчету результатов, убедитесь, что значения концентрации контрольной сыворотки включены в листа контроля качества.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Специфичность

Используемая анти-ДГЭА-С антисыворотка дала следующие перекрестные реакции: 100% с ДГЭА-С и ДГЭА, 19% с андростендионом, 9% андростероном и менее 0,1% с тестостероном, ДГТ, 17-гидроксипрогестероном, прогестероном и эстроном.

Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн, значение + 2 СО), Эта доза составляет **0,08 мкг/мл**,

Точность

Была оценена при определении вариабельности в анализе и между ними на основании 3 сывороток при разных концентрациях ДГЭА-Са,

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн, (мкг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	0,472	0,024	5,1	12
B	1,39	0,092	6,6	12
C	2,61	0,127	4,9	12

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн, (мкг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	0,52	0,63	12,1	10
B	1,25	0,12	9,6	10
C	2,48	0,22	8,9	10

Достоверность

Проверена при проведении испытаний на восстановление и параллелизм:

Испытание на восстановление

Известные количества ДГЭА-С были добавлены к сыворотке и проанализированы.

Добавлено (мкг/мл)	Ожидаемое значение (мкг/мл)	Полученное значение (мкг/мл)	Восстановление %
S1	---	0,26	----
S1 + 1	1,26	1,38	109,5
S1 + 2	2,26	2,32	102,6
S1 + 4	4,26	4,30	100,9

Испытание на параллелизм

Сыворотка с высокой концентрацией ДГЭА-С была проверена нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (мкг/мл)	Полученное значение (мкг/мл)
S2 неразбавл.	---	2,11
1:2	1,05	1,12
1:4	0,53	0,55
1:8	0,26	0,24

11 , ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул, Чорновола, 97
г, Ивано-Франковск, 76005
тел,: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua