

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОНУ СУЛЬФАТУ МЕТОДОМ ІФА

## Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEA-S) Test System

Кат. №: 5125-300А

Дата випуску інструкції: 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

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

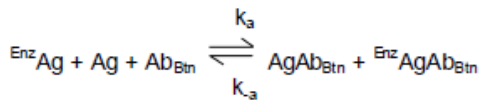
**2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ** (Див. оригінал інструкції).

### 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.



$\text{Ab}_{\text{Btn}}$  = Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

$\text{Ag}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAg}$  = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{Btn}}$  = 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<sub>CW</sub> – 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 ДГЕА-С - 1 мл (мл)/флакон

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

Наприклад: 1 мкг/мл (μg/ml) x 2.71 = 2.71 мкМоль/л (μmol/l)

#### В. Ферментний реагент ДГЕА-С - 6.0 мл (мл)/флакон

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

#### С. Біотиновий реагент ДГЕА-С - 6.0 мл (мл)

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

#### Д. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

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

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

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

#### Ф. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

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

#### Г. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить перекис водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### Н. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

#### І. 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, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 10 та 50 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери перемінного об'єму 200-1000 мкл (μl) для розведення кон'югату
4. Мікропланшетний вошер
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm)
6. Фільтрувальний папір для просушування планшета
7. Поліетиленова 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, ВРС 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, NHS Publication No. (CDC) 88-8395.

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

### 6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи гепаринізованої плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівнюваності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натщесерце. 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 згорнутися (для сироватки). Відцентрифугуйте зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

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 отримання зразка натщесерце.

Зразки можуть бути охолоджені до 2-8 °C (°C) на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.020 мл (ml) 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 (ml) дистильованою чи деіонізованою водою в придатній посудині. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °C (°C) 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 °C (°C).

**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 °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 10 мкл (µl) референсного калібратора сироватки, контрольного зразка та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 50 мкл (µl) Ферментного реагенту ДГЕА-С у кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
- Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) кон'югату біотин-анти-ДГЕА-С 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 (µl) 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 утворення повітряних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) 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 (µl) 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 (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Зауваження:** Зразки з концентрацією вище 8.0 мкг/мл (µg/ml) необхідно розвести в 5 або 10 разів стандартом «0» або пуловою сироваткою з відомо низькою концентрацією ДГЕА-С.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ДГЕА-С 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 ДГЕА-С в мкг/мл (µg/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
- Визначте невідомі концентрації ДГЕА-С 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 (µg/ml) (див. мал.1)

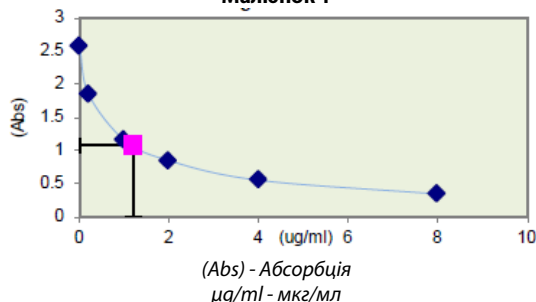
**Примітка:** Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (мкг/мл) (µg/ml)
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 (µg/ml) повинна бути  $\geq 1.8$ .
- Чотири з шести контролів якості повинні впадати 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки з концентрацією вище 8.0 мкг/мл ( $\mu\text{g/ml}$ ) необхідно розвести в 5 або 10 разів, або вище, «0» калібратором ДГЕА-С. Помножьте зчитані дані на фактор розведення для отримання реальних концентрацій.
- 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.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- 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.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- 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.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- 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.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- 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 референсних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції, очікувані значення при використанні даного методу наведені в таблиці 1:

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для тест-системи ДГЕА-С

Населення	Діапазон (мкг/мл ( $\mu\text{g/ml}$ ))
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 ДГЕА-С всередині серії і між серіями визначалася в аналізі півів 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 ( $\mu\text{g/ml}$ ))

Зразок	N	$\bar{x}$	$\delta$	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 ( $\mu\text{g/ml}$ ))

Зразок	N	$\bar{x}$	$\delta$	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 ( $\mu\text{g/ml}$ ) для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (мкг/мл ( $\mu\text{g/ml}$ )) плюс  $2\sigma$  ( $\sigma$  - стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

### 14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним хемілюмінесцентним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом ДГЕА-С (діапазон значень 0.2-7.7 мкг/мл ( $\mu\text{g/ml}$ )). 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 ( $\bar{x}$ )	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. Перехресна реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність
ДГЕА-С	1.0000
ДГЕА	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



**ВИРОБНИК**

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поінт Драйв</i>
<i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i>	<i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i>
<i>Phone: 949.951.2665</i>	<i>Тел.: 949.951.2665</i>
<i>Fax: 949.951.3539</i>	<i>Факс: 949.951.3539</i>
<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>	<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>



**УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

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

