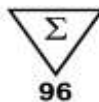
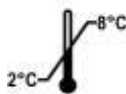


ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

ДГЕА ELISA

REF AA E- 1600



IVD

ВСТУП

Передбачуване використання

ELISA DHEA є конкурентним імунологічним аналізом для кількісного діагностичного вимірювання *in vitro* дегідроепіандростерона (DHEA) у сироватці крові та плазмі.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ПОЯСНЕННЯ

Дегідроепіандростерон (DHEA; андростенолон; 3 β -гідрокси-5-андростен-17-он) є C19 стероїдом, що виробляється у кори надниркових залоз і, меншою мірою, гонадах. DHEA служить попередником синтезу тестостерону та естрогену. Через наявність 17-оксо (а не гідроксильної) групи, DHEA має відносно слабкий андрогенний характер активності, яка оцінюється в ~ 10% від рівня тестостерону. Однак у новонароджених періпубертальних дітей і у дорослих жінок циркуляція рівня ДГЕА може бути в кілька разів вищою, ніж концентрація тестостерону, і може відбутися швидке перетворення периферичних тканин в більш потужні андрогени (андростендіон і тестостерон) та естрогени. Більше того, DHEA має відносно низьку спорідненість до статевих гормонів, що зв'язують глобулін. Ці фактори можуть посилити фізіологічну біопотенцію DHEA.

Фізіологічна роль DHEA не була остаточно визначена. Різноманітні ефекти *in vitro*, в тому числі антипроліферативні ефекти в різних клітинних лініях і вплив на фермент-опосередкований метаболізм клітин були визначені. Дослідження *in vivo* показують, що DHEA може впливати на обмін холестерину та ліпідів, чутливість та секрецію інсуліну та імунну функцію. Аномальні рівні ДГЕА були визначені при шизофренії та ожирінні. Терапевтичне введення ДГЕА було запропоновано для декількох умов, включаючи ожиріння та серцево-судинні захворювання.

Рівень DHEA у сироватці крові є відносно високим у плода та новонародженого, низький у дитинстві та збільшується протягом статевого дозрівання. Підвищений рівень ДГЕА під час передчасного статевого дозрівання може сприяти розвитку вторинного сексуального волосся. Рівень DHEA у сироватці поступово знижується після третього десятиліття життя. Немає послідовних змін у рівні DHEA сироватки крові, що виникає під час менструального циклу або вагітності; Однак, співвідношення може знизити рівень DHEA в сироватці крові у передменопаузальних жінок.

DHEA має швидкий рівень метаболічного очищення порівняно з сульфатним кон'югатом DHEA-S. В зв'язку з цим, рівень DHEA у сироватці в 100-1000 разів нижче рівня DHEA-S. Крім того, рівні DHEA сироватки показують значні добові варіації, які залежать від адренкортикотропного гормону (АКТГ). Рівень DHEA сироватки збільшується у відповідь на екзогенне застосування АКТГ.

Вимірювання сироватки DHEA є корисним маркером синтезу андрогену наднирників.

Аномально низький рівень може відбуватися в гіпоадrenalізмі, а підвищений рівень виникає в декількох умовах; включаючи вірилізуючу аденому наднирників і карциному, 21-гідроксилазу та 3 β -гідроксистероїддегідрогеназу, а в деяких випадках і жіночий гірсутизм. Оскільки дуже низький рівень ДГЕА виробляється гонадами, вимірювання рівня ДГЕА може допомогти в локалізації джерела андрогену в вірилізуючих умовах.

ПРИНЦИП

ELISA набір DHEA - це твердофазний ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA), який базується на принципі конкурентного зв'язування.

Лунки мікропланшета покриті антитілом до ДГЕА. Невідома кількість DHEA, присутня в зразку конкурує з кон'югатом DHEA пероксидазою хрома для зв'язування до антитіл покриття. Після інкубації зв'язаний кон'югат змивається. Кількість кон'югату зв'язаної пероксидази обернено пропорційна концентрації DHEA у зразку. Після додавання розчину субстрату інтенсивність коліру, що розвивається, обернено пропорційна концентрації DHEA у зразку.

ЗАПОБІЖНІ ЗАСОБИ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Цей набір призначений тільки для використання *in vitro*. Тільки для професійного використання.
2. Перед початком аналізу прочитайте інструкцію повністю та уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції, вкладену в пакет набору. Будьте впевнені, що все зрозуміло.
3. Мікропланшет містить відрізнi смужки. Незастосовувані лунки повинні зберігатися при температурі від 2 ° C до 8 ° C у герметичному пакеті з фольги і використовуватись в передбаченому тримачу.
4. Прокапування зразків та реагентів повинно виконуватися якомога швидше і в тій же послідовності для кожного етапу.
5. Використовуйте резервуари лише для окремих реагентів. Це особливо стосується резервуарів субстрату. Використання резервуара для дозування розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може привести до забарвлення розчину. Не вливайте реагенти назад у флакони, оскільки може виникнути забруднення реагентом.
6. Добре змішуйте вміст лунок мікропланшету, щоб забезпечити достовірні результати випробувань. Не використовуйте повторно мікропланшет.
7. Не допускайте висихання лунок під час аналізу; Додайте реагенти відразу ж після завершення процедур промивання.
8. Перед тим, як почати тестування, дайте реагентам досягти кімнатної температури (21-26 ° C). Температура вплине на показники абсорбції аналізу. Однак значення для зразків не впливатимуть.
9. Ніколи не прокапувати ротовою порожниною та уникати контакту реагентів та зразків шкірою та слизовими оболонками.
10. Не куріть, не їжте, не пийте та не наносіть косметику в районах, де обробляються зразки або комплектуючі реактиви.
11. Одягайте одноразові латексні рукавички під час обробки зразків та реагентів. Мікробне забруднення реагентів або зразків можуть давати хибні результати.
12. Обробка повинна здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідним національним законодавством щодо біологічно небезпечних речовин або керівництвом з безпеки або регулюванням.
13. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, як показано на етикетках наборів.
14. Всі зазначені обсяги повинні бути виконані відповідно до протоколу. Оптимальні результати тесту отримуються тільки при використанні каліброваних піпеток і рідерів мікропланшетів.
15. Не змішуйте та не використовуйте компоненти з наборів з різними номерами лотів. Рекомендується не обмінювати лунки різних плит навіть однієї партії. Набори могли транспортуватися або зберігатися в різних умовах і зв'язувальні характеристики пластин можуть стати дещо різними.
16. Уникайте контакту з стоп розчином. Це може спричинити подразнення шкіри.
17. Хімікати та підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національного законодавства щодо біологічно небезпечних речовин або регулювання.
18. Для отримання інформації зверніться до Паспортів з безпеки матеріалів. Паспорти безпеки для даного продукту доступні за запитом безпосередньо від виробника.

2. РЕАГЕНТИ

Реагенти надані

AA E-1631 Мікропланшет

12x8 (стріпи, що розламуються) з 96 лунками; Лунки, покриті антитілом до ДГЕА.

Стандарти

Готові до використання

	Кат. №	Стандарт	Концентрація	Обсяг /флаконт
Стандарт А	АА Е 1601	Стандарт А(0)	0 нг/мл	0,6 мл
Стандарт В	АА Е 1602	Стандарт В(1)	0,3 нг/мл	0,6 мл
Стандарт С	АА Е 1603	Стандарт С(2)	1 нг/мл	0,6 мл
Стандарт D	АА Е 1604	Стандарт D(3)	3 нг/мл	0,6 мл
Стандарт Е	АА Е 1605	Стандарт Е(4)	10 нг/мл	0,6 мл
Стандарт F	АА Е 1606	Стандарт F(5)	30 нг/мл	0,6 мл

CONTROL1 +CONTROL 2 АА Е-1651 + АА Е-1652 Контроль низький / Контроль високий

2 флакони по 0,6 мл, готові до використання; містять ДГЕА в сироватці крові.
Для контрольних значень та діапазонів, будь ласка, зверніться до QC-Datasheet

CONJUGATE АА-Е-1640 Ферментний кон'югат

1 флакон, 13 мл, готовий до використання; Пероксидаза хрину маркована ДНЕА у буферизованій матриці.

Substrate АА Е-1655 Розчин субстрата

1 флакон, по 26 мл кожен, готовий до використання; Містить тетраметілбензидін (ТМБ)

STOP SOLN АА Е-1680 СТОП РОЗЧИН

1 флакон, 9 мл, готовий до використання; Містить 2 н розчину соляної кислоти

WASH-CONC 10 x AR E-0030 розчин для миття

2 флакони, кожен по 50 мл (концентрований 10X);

Див. "Підготовка реагенту".

Примітка. Додатковий стандарт А для розведення зразків доступний за запитом.

Необхідні матеріали, але не надані

- рідер мікропланшетів, здатний вимірювати кінцеву точку при 450 нм
- Калібровані мікропіпетки із змінною точністю (25 мкл, 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл).
- міксер мікропланшетів, що працює більше 600 об / хв
- абсорбуючий папір
- Дистильована або деіонізована вода
- Таймер
- Напівлогарифмічний графічний папір або програмне забезпечення для зменшення даних

Умови зберігання

При зберіганні при температурі від 2 ° С до 8 ° С нерозкриті реагенти будуть стабільними до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти за межами цієї дати. Відкриті реагенти необхідно зберігати при температурі від 2 ° С до 8 ° С. Після першого відкриття реагенти стабільні 30 днів, якщо вони використовуються та зберігаються належним чином. Лунки мікропланшета повинні зберігатись при температурі від 2 ° С до 8 ° С. Подбайте, щоб пакет з фольги був ретельно закритий.

Підготовка реагентів

Перед тим як розпочати тест, дайте реагентам та необхідній кількості лунок досягти кімнатної температури (21-26 ° C)

Промивний розчин:

Розбавте 50 мл 10X концентрованого промивного розчину з 450 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 500 мл. Розведений розчин для миття стабільний щонайменше протягом 12 тижнів при кімнатній температурі (21-26 ° C).

Утилізація наборів

Утилізація комплекту повинна бути зроблена відповідно до національних правил. Спеціальна інформація для цього продукту наведена в Паспорті безпеки матеріалів.

Пошкоджені тест-набори

У випадку будь-якого серйозного пошкодження випробувального комплекту чи компонентів виробник повинен бути проінформований письмово, не пізніше, ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не повинні використовуватися для тестування. Вони повинні зберігатися до прийняття остаточного рішення. Після цього вони повинні бути утилізовані відповідно до офіційного положення.

ЗРАЗОК

Для визначення DHEA сироватку або плазму (EDTA) можна використовувати. Процедура вимагає 25 мкл проби на лунку. Зразки слід негайно аналізувати або аліквотувати, а також зберігати при ≤ -20 ° C. Уникайте повторних циклів замороження – розтавання. Зразки, які, як очікується, містять концентрації DHEA вище, ніж найвищий стандарт (30 нг / мл) , слід розбавити стандартом А перед аналізом. Додатковий крок розбавлення повинен бути взятий до уваги для розрахунку результатів. Не використовуйте сильно гемолітичні, жовтяничні або грубо ліпемічні зразки.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Загальні зауваження

- Всі реагенти та зразки повинні бути доведені до кімнатної температури перед використанням. Всі реактиви повинні бути змішані без спінювання.
- Після початку випробування всі кроки повинні бути завершені без перерви.
- Скористайтеся новими наконечниками для піпетки для кожного стандарту, контрольного або зразка, щоб уникнути перехрестного забруднення.
- Абсорбція є функцією часу і температури інкубації. Перед початком аналізу рекомендується, щоб усі реагенти були підготовлені, зняті ковпачки, всі необхідні лунки, закріплені у тримачі тощо. Це забезпечить рівний проміжок часу для кожного етапу прокапування без перерви.
- Зазвичай ферментативна реакція лінійно пропорційна часу та температурі.
- Дотримуйтесь часу інкубації, який зазначений в цій інструкції для використання.

Процедура аналізу

Кожен прогон повинен включати стандартну криву.

1. Підготуйте достатню кількість лунок мікропланшета, щоб розмістити стандарти та зразки

у двох примірниках.

2. Розподіліть 25 мкл кожного стандарту, зразка та контролю за допомогою нових одноразових наконечників у відповідні лунки.

3. Розподіліть 100 мкл ферментного кон'югату в кожен лунку.

4. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі на шейкері (> 600 об / хв.).

Важлива примітка:

Оптимальна реакція в цьому дослідженні помітно залежить від струсу мікропланшета!

5. Видаліть вміст лунок та промити лунки 4 рази розведеним промивним розчином (300 мкл на лунку). Видаліть якомога більше промивного розчину, постукавши мікропланшетом на абсорбуючий папір.

6. До кожної лунки додайте 200 мкл субстратного розчину.

7. Інкубуйте без струсу протягом 30 хвилин у темряві.

8. Зупиніть реакцію, додавши до кожної лунки 50мкл стоп-розчину.

9. Визначте абсорбцію кожної лунки при 450 нм. Рекомендується прочитати лунки на протязі 15 хвилин.

Розрахунок результатів

1. Обчислити середні значення абсорбції для кожного набору стандартів, контролів та зразків.

2. Використовуючи напів-логарифмічний графічний папір, побудуйте стандартну криву шляхом побудови отриманої середньої абсорбції від кожного стандарту навпроти його концентрації з величиною абсорбції по вертикалі (Y) і концентрації на горизонтальній (X) вісі.

3. Використовуючи середнє значення абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію з калібрувальної кривої.

4. Автоматизований метод: Результати в вкладищу упаковки були розраховані автоматично за допомогою 4 PL(4 параметри логістики) крива побудована . 4 Параметр Логістика є найкращим методом розрахунку. Інші дані редукційні функції можуть дати дещо інші результати.

5. Концентрацію зразків можна визначити безпосередньо з цієї стандартної кривої. Зразки з концентрацією, вищі, ніж у найвищому стандарті, повинні бути додатково розбавлені. Для розрахунку концентрації, цей коефіцієнт розбавлення повинен бути врахований.

Приклад типової стандартної кривої

Наведені дані призначені лише для ілюстрації та не повинні використовуватися для обчислення результатів з іншого прогону.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт А (0 нг/мл)	3,003
Стандарт В (0,3 нг/мл)	2,501
Стандарт С (1 нг/мл)	1,912
Стандарт D (3 нг/мл)	1,220
Стандарт Е (10 нг/мл)	0,647
Стандарт F (30нг/мл)	0,341

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала власні нормальні та ненормальні значення.

У дослідженні, проведеному з очевидно здоровими дорослими, з використанням ELISA ДГЕА, такі значення спостерігаються:

Населення	Діапазон
Дорослі чоловіки	1,8-12,5 нг/мл
Дорослі жінки	1,3-9,8 нг/мл

Самі по собі результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Вони повинні бути співвіднесені з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

Аналітична чутливість

Найнижчий аналітичний виявлений рівень DHEA, який можна відрізнити від стандарту А, становить 0,07 нг / мл на рівні 2SD довірча межа.

Специфічність (перехресна реактивність)

Для перехресної реактивності були оцінені наступні матеріали. Відсоток показує перехресну реактивність при 50% переміщення в порівнянні з DHEA.

Стероїд	% перехресної реакції
DHEA-S	<0,01
Тестостерон	<0,01
5 α -дигідротестостерон	<0,01
Андростендіон	0,06
Прогестерон	0,23
17 α -гідроксипрогестерон	<0,01
Прегнонолон	0,01
17-гідрокси-Прегнонолон	0,07
Дезоксикортикостерон	0,05
Кортикостерон	<0,01
Кортизол	<0,01

Аналіз динамічного діапазону

Діапазон аналізу становить від 0,3 до 30 нг / мл.

Відтворюваність

Внутрішній аналіз Intra - аналіз

Внутрішньо -аналіза варіації були визначені по 20 повторних вимірювань трьох сироваткових зразків в одному прогоні. Внутрішня варіабельність аналізу показана нижче:

	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3
Середнє (нг/мл)	2,08	5,34	20,84
SD	0,16	0,39	1,511
CV (%)	7,9	7,3	7,3
Кількість N =	20	20	20

Інтер -аналіз

Інтер -аналіз (між прогоном) варіації визначався дублюючими вимірами трьох сироваткових зразків в 11 різних тестів.

	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3
Середнє (нг / мл)	2,14	5,26	20,63
SD	0,15	0,27	1,03
CV (%)	6,9	5,1	5,0
Кількість N =	11	11	11

Відновлення

Використовуючи стандартну матрицю, готували концентрований (збагачений) розчин 1000 нг DHEA / мл. 500 мкл із трьох сироваток було збагачено 1,5, 3 і 5 мкл концентрованого розчину, що залишає сироваткові матриці відносно незайманими. Всі зразки були виміряні процедурою ELISA ДГЕА.

зразок	Концентрація (нг/мл)	Вимірюється (нг/мл)	Очікуване (нг/мл)	Відновлення (%)
1	-	0	-	-
	3	2,63	3	88%
	6	5,52	6	92%
	10	10,04	10	100%
2	-	0,96	-	-
	3	3,36	3,96	85%
	6	5,67	6,96	81%
	10	8,73	10,96	80%
3	-	1,69	-	-
	3	4,05	4,69	86%
	6	7,11	7,69	92%
	10	10,24	11,69	88%

Линійність

Три зразки сироватки аналізували нерозбавленими і розбавленими стандартом А.

зразок	розведення	Вимірюється (нг/мл)	Очікуване (нг/мл)	Линійність (%)
1	-	11,34	/	/
	1:2	5,91	5,67	104%
	1:4	3,24	2,84	114%
	1:8	1,55	1,48	105%
2	-	4,78	/	/
	1:2	2,57	2,39	108%
	1:4	1,23	1,2	103%
	1:8	0,49	0,6	82%
3	-	12,08	/	/
	1:2	6,57	6,04	109%
	1:4	3,57	3,02	118%
	1:8	1,82	1,51	120%

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкції, вкладеної в пакет та з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яка неналежна обробка зразків або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

Вплив ліків

Будь-які медикаменти (крем, олія, таблетки тощо), що містять DHEA, суттєво вплинуть на вимірювання цього аналізу.

ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ

Надійність результатів

Тест повинен бути виконаний точно відповідно до інструкцій виробника для використання. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (Good Laboratory Practice) належної лабораторної практики або інших застосованих національних стандартів та / або Законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в процедуру аналізу достатню кількість контролів для підтвердження точності і випробування.

Результати тесту є дійсними, лише якщо всі контролі знаходяться в межах зазначеного діапазону та якщо всі інші параметри тесту є також в рамках зазначених специфікацій аналізу. У разі будь-якого сумніву або стурбованості звертайтеся до виробника.

Терапевтичні наслідки

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні ґрунтуватися на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тесту є в угоді з пунктами, зазначеними в пункті "Надійність результатів". Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки в тих випадках, коли лабораторні результати є прийнятні з урахуванням загальної клінічної картини, пацієнт повинен отримати терапевтичні наслідки.

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

Відповідальність

Будь-яка модифікація тестового комплекту та / або обмін або суміш будь-яких компонентів різних партій з одного тест набору до іншого може негативно вплинути на передбачувані результати та обґрунтованість загального тесту. Така модифікація та / або обмін є недійсними для будь-яких претензій на заміну.

Претензії, подані через неправильне розуміння клієнтом результатів лабораторних досліджень за пунктом «Терапевтичні наслідки» також є недійсними. Незважаючи на це, у разі будь-якої претензії відповідальність виробника не перевищує ціни тестового набору. Будь-який збиток, нанесений тест-набору час перевезення, не підлягає відповідальності виробника

ЛІТЕРАТУРА

1. Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? J Endocrinol. 2005 Nov;187(2):169-96.
2. De Pergola G, Giagulli VA, Garruti G, Cospite MR, Giorgino F, Cignarelli M, Giorgino R. Low dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women with very high body mass index. Metabolism. 1991 Feb;40(2):187-90
3. Zumoff B, Rosenfeld RS, Strain GW, Levin J, Fukushima DK. Sex differences in the twenty-four-hour mean plasma concentrations of dehydroisoandrosterone (DHA) and dehydroisoandrosterone sulfate (DHAS) and the DHA to DHAS ratio in normal adults. J Clin Endocrinol Metab. 1980 Aug;51(2):330-3
4. Carlstrom K, Brody S, Lunell NO, Lagrelus A, Mollerstrom G, Pousette A, Rannevik G, Stege R, von Schoultz B. Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex. Maturitas. 1988 Dec;10(4):297-306
5. Lee PD, Winter RJ, Green OC. Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature. Pediatrics. 1985 Sep;76(3):437-44.
6. Belanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Labrie F. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. J Clin Endocrinol Metab. 1994 Oct;79(4):1086-90.

Умовні позначення:

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо <N> випробувань
 Дата закінчення строку дії	LOT Код партії	IVD Тільки для діагностики в лабораторних умовах!
 Зверніться до інструкції з використання	CONT Зміст	CE Маркіровка