WSTĘP

1.1 Przeznaczenie

Test **DRG DHEA-S ELISA** jest testem immunoenzymatycznym do ilościowego diagnostycznego oznaczania DHEA-S w surowicy i osoczu w warunkach in vitro.

1.2 Streszczenie i Wyjaśnienia

Dehydroepiandrosteron (5-Androsten-3β-0L-17-on, Androstenolon, Dehydroizoandrosteron, Transdehydroandrosteron, DHEA) jest hormonem sterydowym występującym we krwi głównie w postaci siarczanu (DHEA-S).

DHEA-S jest bardziej swoistym produktem nadnerczy i pomiar tego steroidu jest szeroko stosowany w praktyce klinicznej.

W praktyce klinicznej oznaczanie DHEA-S w osoczu krwi jest stosowane w diagnostyce rozrostu kory nadnerczy i diagnostyce różnicowej hirsutyzmu (1).

2. ZASADA OZNACZENIA

Ten test immunoenzymatyczny stałej fazy (ELISA) DRG DHEA-S ELISA opiera się na zasadzie wiązania konkurencyjnego. Studzienki są pokryte przeciwciałem poliklonalnym skierowanym przeciw niepowtarzalnemu miejscu antygenowemu na cząsteczce DHEA-S. Endogenny DHEA-S znajdujący się w próbce pobranej od pacjenta konkuruje z roztworem sprzężonym DHEA-S-peroksydaza chrzanowa o wiązanie z przeciwciałem pokrywającym. Po inkubacji niezwiązany roztwór sprzężony jest wymywany.

Ilość związanego roztworu sprzężonego peroksydazy jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia DHEA-S w próbce. Po dodaniu roztworu substratu natężenie powstałego koloru jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia DHEA-S próbce pobranej od pacjenta.

3. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Niniejszy zestaw przeznaczony jest wyłącznie do zastosowania diagnostycznego w warunkach in vitro.
- Informacje dotyczące niebezpiecznych substancji zawartych w zestawie można znaleźć w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej.
- Wszystkie odczynniki niniejszego zestawu testowego, które zawierają ludzką surowicę lub osocze, przebadano z wynikiem ujemnym na obecność HIV I/II, antygenu HBs i HCV procedurami zatwierdzonymi przez FDA. Jednakże, wszystkimi odczynnikami należy posługiwać się i wyrzucać je jak substancje potencjalnie niebezpieczne.
- Unikać kontaktu z roztworem zatrzymującym reakcję, zawierającym 0,5 M H_2SO_4. Może powodować podrażnienie skóry i oparzenia.
- Nigdy nie pipetować ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi.
- Nie palić, nie jeść, nie pić i nie stosować kosmetyków w miejscach, gdzie stosuje się próbki i odczynniki zestawu.
- Przy posługiwaniu się próbkami i odczynnikami stosować jednorazowe rękawiczki lateksowe. Zanieczyszczenie odczynników lub próbek drobnoustrojami może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników.
- Próbkami i odczynnikami należy posługiwać się zgodnie z procedurami określonymi w odpowiednich krajowych wytycznych i regulacjach dotyczących bezpieczeństwa biologicznego.
- Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykietach zestawu.
- Należy przestrzegać wszystkich objętości podanych w protokole. Optymalne wyniki oznaczenia można uzyskać tylko przy stosowaniu kalibrowanych pipet i czytnika płytek
- Nie mieszać i nie stosować elementów zestawów o różnych numerach serii. Zaleca się nie mieszać studzienek z różnych płytek nawet w obrębie tej samej serii. Zestawy mogą być

transportowane lub przechowywane w różnych warunkach i charakterystyki wiązania płytek mogą się nieznacznie różnić.

- Substancje chemiczne i przygotowane lub stosowane należy traktować odczynniki jak niebezpieczne odpadki, zgodnie z krajowymi wytycznymi lub regulacjami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.
- Karty Charakterystyki dla tego produktu dostępne są na życzenie bezpośrednio w firmie DRG.

Karty Charakterystyki dostosowane do wymogów: UE-Wytyczna 91/155 WE.

4. ODCZYNNIKI

4.1 Zawartość zestaw

1. ***Mikrostudzienki***, 12 x 8 (odłamywanych) pasków, 96 studzienek

Studzienki są pokryte przeciwciałem poliklonalnym skierowanym przeciw miejscu antygenowemu na cząsteczce DHEA-S.

2. ***Standard (Standard 0 - 6)***, 7 fiolek, 1 ml każda, gotowe do użycia;

Stężenia: 0 - 0,1 - 0,5 – 1 – 2,5 - 5- 10 µg/ml

Przelicznik: 1 µg/ml = 2,6 µmol/l

* zawierają 0,03% Proclin 300 i 0,005% siarczanu gentamycyny jako środki konserwujące.

3. Roztwór sprzężony enzymu, 1 fiolka, 25 ml, gotowy do użycia;

DHEA-S sprzężony z peroksydazą chrzanową;

*zawiera 0,03% Proclin 300, 0,015% BND i 0,010% MIT jako środki konserwujące.

4. Roztwór substratu, 1 fiolka, 14 ml, gotowy do użycia.

Tetrametylobenzydyna (TMB).

5. Roztwór zatrzymujący reakcję, 1 fiolka, 14 ml, gotowy do użycia

zawiera 0,5 M H_2SO_4.

Unikać kontaktu z roztworem zatrzymującym reakcję. Roztwór ten może powodować podrażnienia skóry i oparzenia.

6. Roztwór płuczący, 1 fiolka, 30 ml (40 x stężony)

Patrz „Przygotowanie odczynników".

* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioksan

MIT = 2-metylo-2H-izotiazol-3-on

UWAGA: Dodatkowy Standard zero do rozcieńczania próbek jest dostępny na życzenie.

4.1.1 Materiały niezbędne, ale niezawarte w zestawie

- Kalibrowany czytnik płytek mikrotitracyjnych (450±10 nm) (np. Licznik płytek mikrotitracyjnych DRG International).
- Kalibrowane nastawne precyzyjne mikropipety.
- Bibuła.
- Woda destylowana.

4.2 Warunki przechowywania

Nieotwarte odczynniki, przechowywane w temperaturze 2 - 8°C, zachowują reaktywność do upływu terminu ważności. Nie stosować odczynników po dej dacie.

Otwarte odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2- 8°C. Studzienki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C. Po otwarciu torebki foliowej należy ją ponownie uważnie szczelnie zamknąć.

4.3 Przygotowanie odczynników

Przed użyciem pozostawić wszystkie odczynniki oraz wymaganą liczbę pasków, do osiągnięcia temperatury pokojowej.

Roztwór płuczący

Dodać wody dejonizowanej do 40 x stężonego roztworu płuczącego.

Rozcieńczyć 30 ml stężonego roztworu płuczącego w 1170 ml wody dejonizowanej, do końcowej objętości 1200 ml.

Rozcieńczony roztwór płuczący zachowuje stabilność przez 2 tygodnie w temperaturze pokojowej.

4.4 Pozbywanie się zestawu

Zestaw należy wyrzucać zgodnie z krajowymi przepisami prawnymi. Specjalne informacje dotyczące niniejszego produktu zawarte są w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej

4.5 Uszkodzone zestawy testowe

W przypadku każdego poważnego uszkodzenia zestawu testowego lub jego elementów należy poinformować o tym na piśmie DRG®, nie później niż jeden tydzień po otrzymaniu zestawu. Nie należy w oznaczeniu stosować poważnie uszkodzonych pojedynczych elementów zestawu. Należy je przechowywać do momentu uzgodnienia ostatecznego rozwiązania. Następnie należy się ich pozbyć zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi.

5. PRÓBKI

W tym teście można stosować próbki surowicy lub osocza (krwi pobranej na EDTA, heparynę lub cytrynian).Nie stosować próbek z makroskopową hemolizą, żółtaczkowych ani lipemicznych.

Uwaga: **W tym teście nie należy stosować próbek zawierających azydek sodu.**

5.1 Pobieranie i przygotowanie próbek

Surowica:

Pobrać krew z żyły (np. przy użyciu Sarstedt Monovette nr 02.1388.001), pozostawić do wytworzenia skrzepu i oddzielić surowicę przez wirowanie w temperaturze pokojowej. Nie wirować próbek przed wytworzeniem skrzepu. U pacjentów otrzymujących leki przeciwkrzepliwe czas powstawania skrzepu może być wydłużony.

Osocze:

Pełną krew należy pobrać do probówek do wirowania zawierających środek przeciwkrzepliwy i odwirować bezpośrednio po pobraniu (np. osocze krwi pobranej na EDTA Sarstedt Monovette – czerwony korek - nr 02.166.001; osocze krwi pobranej na heparynę Sarstedt Monovette – pomarańczowy korek - nr 02.165.001; osocze krwi pobranej na cytrynian Sarstedt Monovette – zielony korek - nr 02.167.001.)

5.2 Przechowywanie próbek

Próbki należy zamknąć korkiem i można je przechowywać przed oznaczeniem przez maksymalnie 5 dni w temperaturze 2 - 8°C. Próbki przechowywane przez dłuższy czas przed oznaczeniem należy zamrozić, jednorazowo, w temperaturze -20°C. Rozmrożone próbki przed oznaczeniem należy kilkakrotnie odwrócić.

5.3 Rozcieńczanie próbek

Jeżeli wynik pierwszego oznaczenia wskazuje, że próbka zawiera wyższe stężenie niż najwyższy standard, próbkę taką można rozcieńczyć Standardem zero i oznaczyć ponownie, jak opisano w Procedurze oznaczenia.

Przy obliczaniu stężenia w oznaczanej próbce należy wziąć pod uwagę współczynnik rozcieńczenia.

Przykład:

a. Rozcieńczenie w stosunku 1:10: 10 µl surowicy + 90 µl Standardu zero (dobrze wymieszać)

b. Rozcieńczenie w stosunku 1:100: 10 µl rozcieńczenia a) 1:10 + 90 µl Standardu zero (dobrze wymieszać).

6. PROCEDURA OZNACZENIA

6.1 Ogólne uwagi

- Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki należy pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Wszystkie odczynniki należy wymieszać bez wytwarzania piany.
- Po rozpoczęciu oznaczenia wszystkie jego etapy należy wykonywać bez przerw.
- Dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego, należy stosować nowe jednorazowe plastikowe końcówki pipet do pipetowania każdego standardu, kontroli i próbki.
- Absorbancja jest funkcją czasu inkubacji i temperatury. Przed rozpoczęciem oznaczenia zaleca się przygotowanie wszystkich odczynników, zdjęcie korków, umieszczenie wszystkich potrzebnych studzienek w statywie, itp. Dzięki temu każdy etap pipetowania zajmie taką samą ilość czasu i nie będzie pomiędzy nimi żadnych przerw.
- Zgodnie z ogólną zasadą, reakcja enzymatyczna jest liniowo proporcjonalna do czasu i temperatury.

6.2 Procedura oznaczenia

W ramach każdego oznaczenia należy sporządzić krzywą standardową

1. W statywie umieścić pożądaną liczbę studzienek.
2. Do odpowiednich studzienek odmierzyć po **25 µl** ***standardu, kontroli i próbek***, nowymi jednorazowymi końcówkami do pipet.
3. Do każdego zagłębienia odmierzyć **200 µl** ***Roztworu sprzężonego enzymu***.

   Dobrze wymieszać przez 10 sekund. Ważne jest, aby w tym etapie dokładnie wymieszać zawartość studzienek.
4. Inkubować przez **60 minut** w temperaturze pokojowej (bez przykrywania płytek)
5. Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek.

   3-krotnie płukać studzienki rozcieńczonym roztworem płuczącym (400 µl na studzienkę). Energicznie uderzyć płytką o bibułę w celu usunięcia resztek ich zawartości.

   Ważna uwaga: czułość i precyzja tego oznaczenia w dużym stopniu zależą od właściwego wykonania procedury płukania!
6. Do każdej studzienki dodać 1**00 µl** ***Roztworu substratu***.
7. Inkubować przez 15 **minut** w temperaturze pokojowej.
8. Zatrzymać reakcję enzymatyczną przez dodanie do każdej studzienki **50 µl** ***Roztworu zatrzymującego reakcję***.
9. Odczytać absorbancję (OD) każdej studzienki przy długości fali **450 ± 10 nm** przy użyciu czytnika płytek. Zaleca się odczytanie studzienek w ciągu **10 minut** od dodania *roztworu zatrzymującego reakcję*

6.3 Obliczanie wyników

1. Dla każdego zestawu standardów, kontroli i próbek pacjenta obliczyć średnią wartość absorbancji.
2. Skonstruować krzywą wzorcową przez odłożenie średniej absorbancji uzyskanej dla każdego standardu wobec podanego stężenia DHEA-S w danym standardzie, przy czym wartość absorbancji należy odłożyć na osi pionowej (Y), a stężenie estronu na osi poziomej (X).
3. Przy użyciu średniej wartości absorbancji dla każdej próbki, z krzywej wzorcowej określić odpowiednie stężenie estronu.
4. Metoda automatyczna: Wyniki w IFU można obliczyć automatycznie przy użyciu dopasowania 4 PL (4-parametrowego logistycznego). Zalecaną metodą jest dopasowanie 4-parametrowe logistyczne. Inne funkcję obróbki danych mogą dać nieco inne wyniki.
5. Stężenie w próbkach można odczytać bezpośrednio z tej krzywej standardowej. Próbki, w których stężenie jest wyższe od stężenia w najwyższym standardzie, należy dodatkowo rozcieńczyć standardem zero.. Przy obliczaniu wyników stężenia należy uwzględnić ten współczynnik rozcieńczenia.

6.3.1 Przykład typowej krzywej standardowej

Poniższe dane przedstawiono wyłącznie w celach ilustracyjnych; **nie wolno** posługiwać się nimi zamiast danych uzyskanych w przeprowadzonym oznaczeniu.

Standard	**Jednostki gęstości optycznej (450 nm)**
Standard 0 (0 µg/mL)	1,69
Standard 1 (0,1 µg/mL)	1,35
Standard 2 (0,5 µg/mL)	0,93
Standard 3 (1,0 µg/mL)	0,67
Standard 4 (2,5 µg/mL)	0,46
Standard 5 (5.0 µg/mL)	0,33
Standard 6 (10 µg/mL)	0,23

7. WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zdecydowanie zaleca się, aby każde laboratorium określiło własny zakres wartości prawidłowych i nieprawidłowych.

W badaniu zdrowych dorosłych osób uzyskano następujące wartości w teście DRG DHREA-S ELISA

Mężczyźni	<50 lat	0,59 – 2,96 µg/mL
	> 50 lat	średnia: 1.01 µg/mL
Kobieta	<50 lat	0,40 -2.17 µg/mL
	>50 lat	średnia: 0,63 µg/mL

8. KONTROLA JAKOŚCI

Dobra praktyka laboratoryjna wymaga oznaczania kontroli przy okazji sporządzania każdej krzywej standardowej. Należy oznaczyć statystycznie istotną liczbę kontroli w celu wyznaczenia wartości średnich i dopuszczalnych przedziałów wartości dla zagwarantowania właściwej charakterystyki testu.

Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych, zgodnie z krajowymi przepisami prawnymi. Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych w celu zagwarantowania codziennej wiarygodności wyników oznaczenia. Należy oznaczać próbki kontrole zawierające zarówno prawidłowe, jak i patologiczne stężenia analizowanej substancji.

W certyfikacie kontroli jakości dołączonym do zestawu podano stężenia DHEA-S w odpowiednich kontrolach. Podane wartości i przedziały wartości zawarte w certyfikacie kontroli jakości zawsze dotyczą zestawu o danym numerze serii i nie należy posługiwać się nimi do bezpośredniego porównywania wyników.

Zaleca się także uczestnictwo w krajowych lub międzynarodowych programach oceny jakości w celu zagwarantowania dokładności wyników.

Należy stosować odpowiednie metody statystyczne do analizy wartości kontrolnych. Jeżeli wyniki oznaczenia nie mieszczą się w ustalonych dopuszczalnych przedziałach wartości dla próbek kontrolnych, wyniki uzyskane dla próbek pacjenta należy uznać za niewiarygodne.

W takim przypadku, proszę sprawdzić następujące kwestie: przyrządy do pipetowania i stoper, czytnik, daty ważności odczynników, warunki przechowywania i inkubacji, metody aspiracji i wymywania.

Po sprawdzeniu wspomnianych wyżej kwestii i nie znalezieniu błędu, proszę skontaktować się ze swoim dystrybutorem lub bezpośrednio z firmą DRG.

9. CHARAKTERYSTYKA TESTU

9.1 Zakres dynamiczny testu

Zakres testu wynosi 0-10 µg/mL.

9.2 Swoistość przeciwciał (reaktywność krzyżowa)

Następujące substancje przebadano pod kątem reaktywności krzyżowej w teście:

Steroid	**% reaktywność krzyżowa**
DHEA-S	100
Androstenodion	20,9
Androsteron	8,5
Siarczan androsteronu	<0.1
Progesteron	4.7
Testosteron	0.3
Estron	0.9
Estriol	<0,1
17-β-Estradiol	<0,1
Siarczan estradiolu	<0,1
Kortyzol	<0,1

9.3 Czułość analityczna

Czułość analityczną obliczono jako średnią minus dwa odchylenia standardowe z dwudziestu (20) powtórzeń oznaczenia standardu zero: 0,44 µg/mL.

9.4 Precyzja

9.4.1 W obrębie oznaczenia

Niżej przedstawiono zmienność w obrębie jednego oznaczenia:

Próbka	n	Średnia (µg/mL.)	Współczynnik zmienności (%)
1	20	0,2	4,6
2	20	1,3	5,1
3	20	4,2	4,7

9.4.2 W obrębie oznaczenia

Niżej przedstawiono zmienność w obrębie oznaczenia:

Próbka	n	Średnia (µg/mL.)	Współczynnik zmienności (%)
1	20	0,2	6,5
2	20	1,3	10,6
3	20	4,4	5,4

9.5 Odzysk

Do próbek dodawano roztwory DHEA-S o znanym stężeniu w stosunku 1:1. Wartości oczekiwane obliczano dodając połowę stężenia określonego dla nierozcieńczonych próbek i połowę stężenia znanych roztworów. % odzysk obliczano mnożąc stosunek wartości zmierzonej do wartości oczekiwanej przez 100.

PRÓBKA	Dodane stężenie 1:1 (obj./obj.) (µg/mll)	Zmierzone stężenie (µg/mll)	Oczekiwane stężenie (µg/mll)	Odzysk (%)
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

Liniowość

PRÓBKA	Rozcieńczenie	Zmierzone stężenie (µg/mll)	Odzysk (%)
1	Brak	4,825	-
	1:2	2,505	104
	1:4	1,191	99
	1:8	0,644	107
	1:16	0,320	106
2	Brak	1,147	-
	1:2	0,620	108
	1:4	0,310	108
	1:8	0,153	107
	1:16	0,078	109
3	Brak	4,200	-
	1:2	2,116	101
	1:4	1,024	98
	1:8	0,486	93
	1:16	0,264	101

10 OGRANICZENIA STOSOWANIA

Każde niewłaściwe postępowanie z próbkami lub modyfikacja tego testu mogą wpływać na uzyskane wyniki.

10.1 Substancje zaburzające oznaczenie

Hemoglobina (w stężeniu do 4 mg/ml), bilirubina (w stężeniu do 0,5 mg/ml) i triglicerydy (w stężeniu do 7,5 mg/ml) nie wpływają na wyniki oznaczenia.

10.2 Leki zaburzające oznaczenie

Dotychczas nie stwierdzono, aby jakiekolwiek substancje (leki) wywierały wpływ na oznaczenie DHEA-S w próbce.

10.3 Efekt zaniżania wyniku oznaczenia przy bardzo wysokim stężeniu oznaczanej substancji

Nie stwierdzono efektu zaniżania wyniku oznaczenia .

11 ASPEKTY PRAWNE

11.1 Wiarygodność wyników testu

Oznaczenie musi być wykonane ściśle według instrukcji użytku producenta. Dodatkowo użytkownik musi ściśle przestrzegać zasad GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej) i innych mających zastosowanie standardów krajowych i/lub przepisów prawnych. Ma to szczególne znaczenie w zakresie stosowania kontrolnych odczynników. Ważne jest, aby w procedurze oznaczenia zawsze uwzględnić wystarczającą liczbę kontroli dla zweryfikowania dokładności i precyzji oznaczenia.

Wyniki oznaczenia są wiarygodne tylko wtedy, gdy wyniki oznaczenia wszystkich kontroli mieszczą się w określonym przedziale wartości i jeżeli wszystkie inne parametry testu są zgodne z podaną specyfikacją oznaczenia. W przypadku wątpliwości proszę kontaktować się z firmą DRG.

11.2 Konsekwencje terapeutyczne

Konsekwencje terapeutyczne nie powinny nigdy opierać się na samych wynikach badań laboratoryjnych, nawet jeśli wszystkie wyniki oznaczeń zgodne są z elementami wymienionymi w

punkcie 11.1. Każdy wynik badania laboratoryjnego stanowi jedynie część całkowitego obrazu klinicznego pacjenta.

Sam wynik niniejszego testu nie powinien nigdy stanowić podstawy dla żadnych konsekwencji terapeutycznych.

11.3 Odpowiedzialność

Wszystkie modyfikacje niniejszego zestawu testowego i/lub wymiana lub wymieszanie jakichkolwiek składników z różnych serii testów mogą mieć niekorzystny wpływ na uzyskane wyniki i wiarygodność całego testu. Takie modyfikacje i/lub wymiany czynią każde żądanie wymiany zestawu testowego bezzasadnym.

Roszczenia składane w związku z błędną interpretacją wyników badań laboratoryjnych zgodnie z punktem 11.2 są także bezzasadne. W przypadku każdego roszczenia odpowiedzialność producenta nie będzie przekraczać wartości zestawu testowego. Producent nie ponosi odpowiedzialności za żadne uszkodzenie zestawu testowego w czasie transportu.

BIBLIOGRAFIA

1. Tietz, N. W., Textbook of Clinical Chemistry, Saunders, 1968