DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch-technischen Produkten und Laborinstrumenten Geselschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Sűd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910/0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at

www.dialab.at

ELISA

DHEA-S
(Dehydroepiandrosteron-sulfát)

Produktový leták

K00203

*ELISA pro **kvantitativní** stanovení Dehydroepiandrosteron sulfátu (DHEA-S) v lidském séru nebo plazmě*

CE IVD

DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch-technischen Produkten und Laborinstrumenten Geselschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Sůd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910/0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at

DHEA-S
(Dehydroepiandrosteron-sulfát)

REF **Obsah**

K00203 - 96 jamek (12x 8-jamkových protilátkou potažených proužků, jednotlivě zlomitelných)

Pouze pro profesionální in vitro diagnostické použití!

OBECNÉ INFORMACE

Metoda	ELISA
Životnost	Viz certifikát analýzy
Skladování	2-8 °C

ÚČEL POUŽITÍ

Kompetitivní imunoenzymatická kolorimetrická metoda analýza pro kvantitativní stanovení koncentrace dehydroepiandrosteron sulfátu (DHEA-S) v lidském séru nebo plazmě.
DHEA-S ELISA kit je určen pouze pro laboratorní použití.

DIAGNOSTICKÉ VÝZNAM

Dehydroepiandrosteron sulfát je přírodní steroidní hormon nacházející se v nadledvinách v lidském těle. DHEA-S vzniká enzymatickou přeměnou DHEA v tkáních nadledvin a extradrenálních tkáních. DHEA-S je také tvořen ve varlatech a vaječnících,tukové tkáni a v mozku. Je nejvýše zastoupeným hormonem v lidském těle a je prekursorem všech pohlavních steroidních hormonů. Protože většina DHEA-S je tvořena v zóně retikularis nadledviny, tvrdí se, že sehrává roli i v imunitní a stresové odpovědi. DHEA-S může mít více biologických rolí. Jeho produkce v mozku naznačuje že sehrává také úlohu jako neurosteroid. Měření DHEA-S v séru je užitečným ukazatelem syntézy androgenů v nadledvinách. Mohou se vyskytovat abnormálně nízké hladiny, které byly popsány jako hypoadrenalismus, zatímco zvýšené hladiny se vyskytují u několika stavů, např. virilizující adrenální adenom a karcinom, deficiencie 21-hydroxylasy a 3β-hydroxysteroid dehydrogenasyy a u několika případů ženského hirsutismu. Ženy se syndromem polycystických vaječníků mají tendenci k normálním nebo mírně zvýšeným hladinám DHEA-S. Velmi málo DHEA-S se vytváří pohlavními žlázami, měření hladin DHEA-S může napomáhat při lokalizaci androgenního zdroje virilizujících podmínek. Hladiny DHEA-S nevykazují diurnální cyklus.

PRINCIP TESTU

DHEA-S (antigen) ve vzorku soutěží s DHEA-S konjugovaným s křenovou peroxidázou (enzymem značený antigen) o vazbu na omezený počet protilátek proti DHEA-S (protilátka) nanesených na mikrotitrační destičku (pevná fáze). Po inkubaci se vykoná separace navázaných/volných molekul jednoduše promytím pevné fáze. Potom enzym HRP v navázané frakci reaguje se substrátem (H_2O_2) a TMB substrátem za vzniku modré barvy, která se změní na žlutou po přidání zastavovacího roztoku.
Intenzita barvy je nepřímo úměrná koncentraci DHEA-S ve vzorku.
Koncentrace DHEA-S ve vzorku se vypočítá z kalibrační křivky.

SLOŽENÍ REAGENCIE

Složky	Popis
Kalibrátory C_0-C_1-C_2-C_3-C_4-C_5	Kalibrátory mají následující koncentraci progesteronu: C_0 C_1 C_2 C_3 C_4 C_5 ng/mL 0 0.1 0.4 1.0 4.0 10.0
Kontrola nízká	1 x 1 mL Koncentrace kontroly je specifická pro šarži a je uvedena na štítku vialky a v listu kontroly kvality.
Kontrola vysoká	1 x 1 mL Koncentrace kontroly je specifická pro šarži a je uvedena na štítku vialky a v listu kontroly kvality.
Roztok pro ředění vzorku	1 x 100 mL HEPES 187 mM pH 7.5; BSA 0.5 g/L
Konjugát	1 x 12 mL/vialku

	DHEA-S konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP)
Roztok substrátu	1 x 15 mL/vialku H_2O_2-TMB (0.26 g/L) (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)
Zastavovací roztok	1 x 15 mL/vialku Kyselina sírová 0.15 mol/L (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)
Promývací roztok	1 x 50 mL/vialku Fosfátový pufr, 0.2 M; pH 7.4, 10x koncentrovaný

POTŘEBNÉ, ALE NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Destilovaná voda
- Automatický dávkovač
- Reader mikrotitračních destiček (450 nm, 620-630 nm)

PŘÍPRAVA REAGENCIE

Příprava kalibrátorů(C_0-C_5) a kontrol

Kalibrátory mají následující koncentrace DHEA-S:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
µg/mL	0	0.1	0.4	1.0	4.0	10.0

Stabilita: do data exspirace uvedeného na kitu. Po otevření jsou kalibrátory stabilní po dobu šesti měsíců při 2–8°C.
Kontroly jsou určeny k přímému použití

Příprava vzorku

Okamžitě před použitím zřeďte každý vzorek 1:50 roztokem pro ředění vzorků (tj. přidejte 980 µL zředěného roztoku pro ředění vzorků a 20 µL vzorku). Dobře smíchejte.

Příprava promývacího roztoku

Obsah každé vialky koncentrátu pufrovaného promývacího roztoku (10x) zřeďte před použitím destilovanou vodou na celkový objem 500 mL. Pro menší objemy dodržujte poměr ředění 1:10. Zředěný promývací roztok je stabilní 30 dní při 2-8 °C.
V koncentrovaném promývacím roztoku je možné pozorovat přítomnost krystalů. V tomto případě jej míchejte při pokojové teplotě až do úplného rozpuštění krystalů. Pro větší přesnost zřeďte celou láhev koncentrovaného promývacího roztoku na 500 mL, dbejte na to, abyste krystaly kompletně přesunuli vypláchnutím láhve, a potom míchejte do jejich úplného rozpuštění.

STABILITA A SKLADOVÁNÍ

Všechny reagencie skladujte při 2-8 °C ve tmě. Sáček s potaženou mikrotitrační destičkou otevřete, až když je při pokojové teplotě a okamžitě po použití jej zavřete. Neodstraňujte přilnavou folii z nepoužitých proužků.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Tento kit je určen pouze pro *in vitro* použití kvalifikovaným personálem. Není určen pro interní ani externí použití u lidí nebo zvířat.
- Používejte vhodné osobní ochranné vybavení během práce s poskytovanými reagenciemi.
- Dodržujte správnou laboratorní praxi (GLP) pro manipulaci s krevními produkty.
- Některé reagencie obsahují jako konzervovadlo malé množství Proclin® 300. Zabraňte styku s pokožkou nebo sliznicemi.
- TMB substrát obsahuje dráždivou látku, která mlže být škodlivá po vdechnutí, požití nebo absorpci přes pokožku. Pro zamezení zranění zabraňte vdechnutí, požití nebo styku s pokožkou a očima.
- Zastavovací roztok pozůstává ze zředěného roztoku kyseliny sírové. Kyselina sírová je jedovatá a žíravá a může být toxická po požití. Pro předcházení chemickým popáleninám zabraňte styku s pokožkou a očima.

ODBĚR A SKLADOVÁNÍ VZORKU

Stanovení DHEA-S možné vykonat v pacientských vzorcích jak séra tak i plazmy. Vzorky skladujte při -20 °C, pokud se stanovení nemá vykonat v den odběru vzorku. Vyhněte se opakovaným cyklům zmražení a rozmražení.

POSTUP TESTU

- Reagencie a vzorky přiveďte na pokojovou teplotu (22-28 °C) na alespoň 30 minut. Na konci analýzy uložte reagencie okamžitě na 2-8 °C, vyhněte se dlouhodobému vystavění pokojové teplotě.
- Nepoužité potažené mikrotitrační proužky je třeba nechat bezpečně ve fóliovém sáčku s desikantem a skladovat při 2-8 °C.
- Pro zabránění potencionální mikrobiální nebo chemické kontaminace se nikdy nesmí nepoužité reagencie vracet do původních vialek.
- Protože je nutné vykonávat stanovení v duplikátech kvůli zlepšení přesnosti výsledků testu, připravte pro každý bod kalibrační křivky (C_0-C_5) dvě jamky, dvě pro každou kontrolu, dvě pro každý vzorek, jednu pro blank.

1. Pipetujte

Reagencie	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Zředěný vzorek/Kontrola	---	**30 µL**	---
Kalibrátory C_0-C_5	**30 µL**	---	---
Enzymový konjugát	**100 µL**	**100 µL**	---

Inkubujte při 37 °C po dobu 60 minut.
Odstraňte obsah každé jamky. Promyjte jamky 300 µL zředěného promývacího roztoku.
Důležitá poznámka: v průběhu každého promývacího kroku jemně třeste destičkou 5 sekund a odstraňte přebytečný roztok oklepáním obrácené destičky na absorpční papírový ubrousek.
Automatická promývačka: pokud používáte automatizované vybavení, promyjte jamky alespoň 5 krát.

Pipetujte

Reagencie	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Roztok substrátu	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**

Inkubujte při pokojové teplotě (22-28 °C) 15 minut ve tmě.
Pipetujte

Reagencie	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Zastavovací roztok	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**

Jemně zatřeste mikrotitrační destičkou. Změřte absorbanci při 450 nm proti referenční vlnové délce 620-630 nm nebo proti blanku v průběhu 5 minut.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

- **Průměrná absorbance**

Vypočtete průměr absorbance pro každý bod kalibrační křivky (C_0-C_5) a pro každý vzorek.

- **Standardní křivka**

Vyneste průměrnou hodnotu absorbance kalibrátorů proti koncentraci. Přeložte nejlépe odpovídající křivku vynesenými body. (např. 4 parametrová logistická).

- **Výpočet výsledků**

Interpolujte hodnoty vzorků na kalibrační křivce pro získání příslušných hodnot koncentrací vyjádřených v µg/mL.

KONTROLA KVALITY A KALIBRACE

Každá laboratoř by měla měřit kontroly s normálními, vysokými a nízkými rozsahy hladin DHEA-S pro sledování činnosti analýzy. S těmito kontrolami je třeba zacházet jako s neznámými a jejich hodnoty určit v každém vykonaném testovacím postupu. Je třeba udržovat tabulky kvality kontroly pro sledování činnosti dodávaných reagencií. Je třeba použít vhodné statistické metody pro zjištění trendů. Jednotlivá laboratoř musí nastavit přijatelné limity činnosti analýzy. Jiné parametry, které je třeba sledovat, jsou 80, 50 a 20% průsečíky kalibrační křivky pro opakovatelnost mezi běhy. Dále musí být maximální absorbance konzistentní s předchozími zkušenosti. Značná odchylka od zavedené činnosti může udávat nepozorovanou změnu v experimentálních podmínkách nebo znehodnocení reagencií kitu. Je třeba použít čerstvé reagencie pro zjištění příčiny odchylek.

CHARAKTERISTIKY ČINNOSTI

- **Preciznost**

Rozptyl v rámci analýzy
Rozptyl v rámci analýzy byl stanoven opakovaným (16x) měřením třech různých kontrolních sér v jedné analýze. Rozptyl v rámci analýzy je ≤ 7.9%.
Rozptyl mezi analýzami
Rozptyl mezi analýzami byl stanoven opakovaným (20x) měřením třech různých kontrolních sér v různých šaržích. Rozptyl mezi analýzami je ≤ 10.4%.

- **Přesnost**

Výtěžnost 0.6 – 1.25 – 2.5 – 5 g/mL DHEA-S přidaného ke vzorku poskytla průměrnou hodnotu (±SD) 102.87%±8.63% vztaženo na původní koncentrace. Test ředění vykonaný na třech sérech zředěných 2 – 4 -8 krát poskytl průměrnou hodnotu (±SD) 100.15% ± 9.02%.

- **Citlivost**

Nejnižší stanovitelná koncentrace DHEA-S rozlišitelná od nulového standardu je 0.04 g/mL při 95% konfidenčním limitu.

- **Specificita**

Křížová reakce protilátky vypočtena při 50% podle Abrahama je uvedena v tabulce:

DHEA-S	100%
DHEA	100%
Androstendion	59%
Androsteron	16%
DHT	1.0%
Testosteron	0.63 %
Estron	0.3%
Progesteron	0.27%
Pregnenolon	0.18%
17OH Progesteron	0.15 %
11-deoxykortizol	0.08 %
Kortizon	0.013 %
Kortizol	< 0.01 %
17β-estradiol	< 0.01 %
Kortikosteron	< 0.01 %
17α-estradiol	< 0.01 %
Cholesterol	< 0.001 %
Estriol	< 0.001 %
Estriol sulfát	< 0.001 %
Aldosteron	< 0.001 %
Estriol-3-sulfát-17-glukuronid	< 0.001 %

- **Specificita: Interferující látky**

Pomocí DHEA-S ELISA kitu vyla zkoumaná Interference bilirubinu, hemoglobinu a triglyceridů:

Látka	Měřená koncentrace	Interference
Bilirubin	0.2 mg/mL	Ne
Hemoglobin	2 mg/dL	Ne
Triglyceridy	6 mg/dL	Ne

Nebyla pozorovaná žádná interference zkoumaných látek; nicméně podle správné laboratorní praxe se i tak doporučuje vyhnout se vysoce lipemickým a hemolyzovaným vzorkům.

- **Specificita: Interferující látky**

Byla vykonána studie porovnání matricového složení progesteronové ELISA metody kvůli vyhodnocení rozdílů mezi typy zkumavek (sérum oddělovací zkumavky (SST), lithium heparinová plazma, sodium heparinová plazma a K2 EDTA plazma) versus kontrolní vzorky (červené kontrolní sérum, bez aditiv) podle směrnic CLSI EP9-A3. Bylo vyhodnoceno celkově 23 vzorků (všechny přirozené) v rozmezí od 0.26 do 40 ng/mL. Na porovnání dat byla vykonána lineární regresní analýza.

Typ vzorku	Interference
SST (sérum separující zkumavka)	Ne
EDTA plazma	Ne
plazma s heparinem lithným	Ne
plazma s heparinem sodným	Ne

Nebyla pozorovaná žádná interference.

Korelace
Dialab DHEA-S ELISA kit byl porovnán s jinou komerčně dostupnou DHEA-S metodou. Bylo analyzovaných 42 vzorků séra a byla vypočtena lineární regresní křivka:
Y = 0.93*X + 0.28
r = 0.961

NÁVAZNOST
Pro kalibraci dehydroepiiandrosteron sulfátové ELISA metody byla vytvořena interní referenční křivka která obsahuje dihydrát sodné soli dehydrooandrosteron 3-sulfátu (Sigma-Aldrich).

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Nesledující rozsahy byly stanoveny progesteronovou ELISA metodou a jsou poskytovány pouze jako příklad. 90% referenční intervaly pro zdánlivě zdravé dospělé byly vypočteny pomocí neparametrické metody podle směrnice od CLSI C28-A3 “Určení, zavedení a ověření referenčních intervalů v klinické laboratoři“.

	Ženy [µg/mL]	Muži [µg/mL]
Novorozenci	0.9 - 1.8	0.9 - 1.8
Před pubertou	0.25 - 1.0	0.25 - 1.0
Dospělí	0.9 - 3.6	0.9 - 3.6
Po menopauze	<0.25 - 1.0	---
Těhotenství	0.25 - 1.8	---

Povšimněte si prosím faktu, že stanovení rozsahu očekávaných hodnot pro „normální“ populaci pro danou metodu závisí na mnoha faktorech, jako specificita a citlivost použité metody a druh zkoumané populace. Proto by měla každá laboratoř brát rozsah udávaný výrobcem jako obecné doporučení a vytvořit si vlastního rozsahu očekávaných hodnot na základě vlastní populace, v místě kde laboratoř působí.

OMEZENÍ

- Tato metoda umožňuje stanovení DHEA-S od 0.1 g/mL do 10 g/mL.
- Klinický význam stanovení DHEA-S může být zneplatněn, pokud byl pacient léčen kortizonem nebo syntetickými steroidy.
- Dodržujte prosím přesně postupnost pipetovacích kroků uvedených v tomto protokolu. Zde uvedené údaje činnosti byly získány s použitím specifických reagencií uvedených v těchto pokynech k použití.
- Všechny reagencie musí být skladovány v chladu při teplotě 2 - 8 °C v jejich původních nádobách. Jakékoli výjimky jsou jasně uvedeny. Reagencie jsou stabilní do data exspirace, pokud jsou skladovány a je s nimi manipulováno podle pokynů.
- Před testováním nechte všechny součásti kitu a vzorky dosáhnout pokojovou teplotu (22-28 °C) a dobře je promíchejte.
- Nezaměňujte součásti kitu z různých šarží. Datum exspirace vytisknutý na označeních krabice a vialek je nutné dodržovat. Nepoužívejte žádné součásti kitu po datu exspirace.
- Pokud používáte automatizované vybavení je vaší zodpovědností ujistit se, že kit byl vhodně otestován.
- Neúplné nebo nepřesné odstranění kapaliny z jamek může ovlivnit přesnost analýzy a/nebo zvýšit pozadí.
- Je důležité, aby byla ve všech jamkách udržena konstantní doba reakce, kvůli opakovatelnosti výsledků. Pipetování vzorků by nemělo trvat déle než 10 minut, aby se zamezilo driftu analýzy. Pokud je potřebných víc jako 10 minut, dodržujte stejné pořadí dávkování. Pokud se používá více než jedna destička, doporučuje se zopakovat kalibrační křivku odezvy v každé destičce.

- Přidání roztoku substrátu spouští kinetickou reakci, která je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Proto musí být TMB substrát a zastavovací roztok přidávány v stejné sekvenci, aby se zamezilo jakýmkoli časovým změnám v průběhu reakce.
- Dodržujte směrnice pro vykonávání kontroly kvality v zdravotnických laboratořích měřením kontrol nebo spoolovaných (spojených) sér.
- Pro rozpouštění a dávkování reagencií je potřebná maximální přesnost.
- V analýze by se neměly používat mikrobiologicky kontaminované vzorky. Stejně by se neměly používat vysoce lipemické nebo hemolyzované vzorky.
- Readery destiček měří vertikálně. Nedotýkejte se spodní strany destičky.

LIKVIDACE ODPADU

Reagencie je třeba likvidovat podle místních nařízení.

LITERATURA

1. Abraham G.E., Maroulis G.B., Buster J.E. Chang R.J. and Marshall J.R. (1976). Effect of Dexamethasone on Serum Cortisol and Androgen Levels in Hirsute Patients. Obstet. Gynecol., 47 (4), 395.
2. Granoff A.B. and Abraham G.E. (1979). Peripheral and Adrenal Venous Levels of Steroids in Patients with Virilizing Adrenal Carcinoma. Obstet. Gynecol., 53 (1), 111.
3. Hopper B.R. and Yen S.S.C. (1975). Circulating Concentration of Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandro-sterone Sulfate During Puberty. Journal of Clinical Endocrinology Metab. 40 (3), 458.
4. Winter J.S.D., Frainam C. and Reyes F.I. (1978). Normal and Abnormal Pubertal Development. Clinical Obstetic and Gynecol., 21 (1), 67.
5. Cristina Mihaela Ghiciuc C.M et al., Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):475–480.

ELISA

www.dialab.at

DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30
e-mail: office@dialab.at