ایده‌آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری DHEA-S در سرم انسان
DHEA-S ELISA Kit 96t
Cat. No: 2624-96 / Rev: B2 (1402/09/22)

مقدمه :

دهیدرو اپی آندروسترون سولفات (DHEA-S) یک استروئید ۱۹ کربنه و پیش‌ساز سنتز تستوسترون و استروژن است که از بخش قشری آدرنال ترشح می شود. اندازه‌گیری DHEA-S سرم در بررسی سنتز آندروژن آدرنال و هیپوآدرنالیسم، آدنوما و کارسینومای غده آدرنال، مردنمایی، کمبود آنزیم‌های ۲۱-هیدروکسیلاز و ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز اهمیت دارد. با وجود واکنش متقاطع بین DHEA-S، آندروستن دیون و آندروسترون، غلظت‌های نسبی این مواد در بسیاری از نمونه‌های پاتولوژیک و نرمال اثر بسیار ناچیزی بر روی نتایج حاصل از اندازگیری DHEA-S خواهد داشت. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح DHEA-S در نمونه سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر پایه الایزای رقابتی طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله صورت می‌پذیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتور (حاوی آنتی‌ژن آزاد و غیرکونژوگه) به همراه DHEA-S کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی‌بادی بیوتینیله به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. آنتی‌ژن‌ها برای اتصال به آنتی‌بادی ضد DHEA-S بیوتینیله که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می‌کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین میزان جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت DHEA-S موجود در آن نسبت معکوس دارد. در نهایت غلظت DHEA-S در نمونه‌ها به‌کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتور (DHEA-S Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۱، ۲، ۴ و ۸ µg/mL، تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (DHEA-S Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) محلول کونژوگه بیوتینی (DHEA-S Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹) محلول کنترل (DHEA-S Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسما (حاوی هپارین یا EDTA) است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۱۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و یا نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید .
۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتورها کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

1. http://www.idealdiag.com/Training.aspx

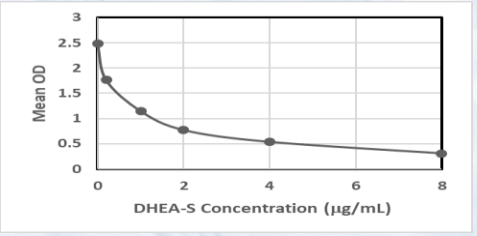
ISO13485 KGS

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۹) مقدار جذب نوری هر چاهک را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری نمایید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logic-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال 0.01 µg/mL) در نظر بگیرد. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µg/mL)
Cal. A	A1	2.478	2.494	0
	B1	2.510		
Cal. B	C1	1.756	1.763	0.2
	D1	1.771		
Cal. C	E1	1.143	1.147	1
	F1	1.152		
Cal. D	G1	0.768	0.771	2
	H1	0.774		
Cal. E	A2	0.532	0.536	4
	B2	0.541		
Cal. F	C2	0.312	0.308	8
	D2	0.304		



مقادیر مورد انتظاربرای تست الایزای DHEA-S

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range (µg/mL)	
Males	0.06 – 4.58
Females	0.03 – 5.88

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت – آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean DHEA-S (µg/mL)	0.73	2.33	6.26
SD (µg/mL)	0.04	0.11	0.31
CV (%)	5.4	4.7	4.9

۲) بررسی دقت – آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean DHEA-S (µg/mL)	0.68	3.49	5.39
SD (µg/mL)	0.05	0.22	0.27
CV (%)	7.3	6.3	5

۳) بررسی درستی – آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت DHEA-S در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (µg/mL)	Added (µg/mL)	Exp. (µg/mL)	Obs. (µg/mL)	% Rec.
1	0.7	2.5	1.6	1.5	94
2	3.6	4.1	3.8	3.7	97.3
3	1.7	4.9	3.3	3.5	106

۴) بررسی درستی – آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست مقدار DHEA-S در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (µg/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	0.9	1.6	-2.5	-2.9	3.8
2	2.7	0.8	-2.1	2.4	3.4
3	4.9	1.6	2.4	2.7	-3

۵) بررسی ویژگی – آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این تست با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم بررسی شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین غلظت ماده اضافه شده به مقدار DHEA-S مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب سنجش شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity
DHEA-S	1.0000
DHEA	0.0004
Androstenedione	0.0003
Dihydrotestosterone	0.0008
Cortisone	<0.0001
Corticosterone	<0.0001
Cortisol	0.0004
Spirolactone	<0.0001
Estriol	<0.0001
Estradiol	<0.0001
Estrone	<0.0001
Testosterone	<0.0001

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با کیت ۰/۰۵ µg/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هر گونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.