

کیت اندازه گیری DHEA-S در سرم انسان
DHEA-S ELISA Kit 96t
Cat. No: 2624-96 / Rev: E4 (1405/07/11)

مقدمه :

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

اصول آزمایش:

این تست بر پایه الایزای رقابتی طراحی شده است. بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی بادی بیوتینیل شده صورت می پذیرد. نمونه های سرم و کالبراتور (حاوی آنتی ژن آزاد و غیر کونژوگه) به همراه DHEA-S کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی بادی بیوتینیل به چاهک ها اضافه می شوند. آنتی ژن ها برای اتصال به آنتی بادی ضد DHEA-S بیوتینیل که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک، با افزودن محلول رنگزا (سوپسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت DHEA-S موجود در آن نسبت معکوس دارد. در نهایت غلظت DHEA-S در نمونه ها به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالبراتور (DHEA-S Cal A-F)، شش ویال با غلظت های ۰،۲، ۰،۴، ۰،۸ و ۱،۶ µg/mL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (DHEA-S Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.

- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (DHEA-S Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.

- ۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
 - ۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
 - ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۹) محلول کنترل (DHEA-S Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده 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 خوانش گر 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشأ انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

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

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. 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 نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

- ۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
- ۲) حجم ۲۰ میکرو لیتر از کالبراتورها، کنترل و یا نمونه ها را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۵۰ میکرو لیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) حجم ۵۰ میکرو لیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۵) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۶) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر برزید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.
- ۷) حجم ۱۰۰ میکرو لیتر محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
- توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالبراتورها کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.
- ۸) حجم ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده واکنش به تمام چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
- ۹) مقدار جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری نمایید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

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

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 پرچسب کالاها

	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	European conformity
	Catalogue number
	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.
توجه: چنانچه از دستگاه‌های الیزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

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 $10 \pm 10\%$ 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
Estrilol	<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 $0.05 \mu\text{g/mL}$ تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{SD}_b$$

(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.

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 $\text{CV} < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean DHEA-S ($\mu\text{g/mL}$)	0.73	2.33	6.26
SD ($\mu\text{g/mL}$)	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 $\text{CV} < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean DHEA-S ($\mu\text{g/mL}$)	0.68	3.49	5.39
SD ($\mu\text{g/mL}$)	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، $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample ($\mu\text{g/mL}$)	Added ($\mu\text{g/mL}$)	Exp. ($\mu\text{g/mL}$)	Obs. ($\mu\text{g/mL}$)	% 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

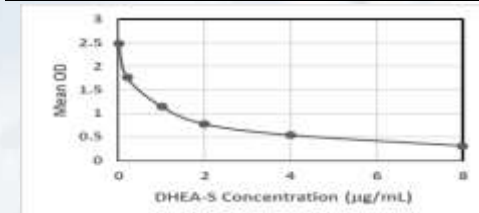
۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

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

No.	Sample ($\mu\text{g/mL}$)	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

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

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
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 انتظار برای تست الیزای 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.

Females	$\mu\text{g/mL}$	Males	$\mu\text{g/mL}$
10-14 years	0.339 - 2.80	10-14 years	0.244 - 2.47
15-19 years	0.651 - 3.68	15-19 years	0.702 - 4.92
20-24 years	1.48 - 4.07	20-24 years	2.11 - 4.92
25-34 years	0.988 - 3.40	25-34 years	1.60 - 4.49
35-44 years	0.609 - 3.37	35-44 years	0.889 - 4.27
45-54 years	0.354 - 2.56	45-54 years	0.443 - 3.31
55-64 years	0.189 - 2.05	55-64 years	0.517 - 2.95
65-74 years	0.094 - 2.46	65-74 years	0.336 - 2.49
> 75 years	0.120 - 1.54	> 75 years	0.162 - 1.23