

## HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

### SZINTETIKUS SZTEROIDOK VIZSGÁLAT (SYN STR)

—evidence—  
**INVESTIGATOR**

#### JAVASOLT FELHASZNÁLÁS

Az Evidence Investigator™ Szintetikus szteroidok vizsgálat egyetlen mintából való többszörös, összefüggő szintetikus szteroid gyógyszermaradványok kvantitatív kimutatására használható. Ez a termék szarvasmarha és ló vizelethez ajánlott.

#### KIZÁRÓLAG ÁLLATGYÓGYÁSZATI ÉS/VAGY ÉLELMISZER ANALITIKAI HASZNÁLATRA.

**Nem használható diagnosztikai eljárásként.**

**A pozitív eredményeket más módszerrel kell megerősíteni.**

#### Cat. No. EV 3694

A következő alkotóelemeket tartalmazza:

1. SYN STR DIL ASY	1 x 8 ml
2. SYN STR CONJ (conc.)	1 x 750 µl
3. SYN STR DIL CONJ	1 x 8 ml
4. SYN STR BIOCHIP	54
biochip	
5. SYN STR CAL	9 x 1 ml
6. SYN STR DIL SPE	2 x 30 ml
7. PX	1 x 10 ml
LUM-EV841	1 x 10 ml
8. BUF WASH (conc.)	1 x 32 ml
9. Kalibrációs lemez és vonalkódok	1

#### JELÖLÉSI ÚTMUTATÓ

SYN STR	Szintetikus szteroidok
DIL ASY	Assay puffer
CONJ (conc.)	Konjugátum koncentrátum
DIL CONJ	Konjugátum oldószer
BIOCHIP	Biochip
CAL	Kalibrátor
DIL SPE	Mintahígító
LUM – EV841	Luminol - EV841
PX	Peroxide
BUF WASH (conc.)	Mosópuffer koncentrátum

#### ALAPELV

Az Evidence Investigator™ Biochip Array Technológia többszörös analitikus egyetlen mintából történő egyidejű kvantitatív kimutatására használatos.

Az alapechnológia a Randox Biochip, egy szilárdtest berendezés, amely különálló array területekből áll, melyek különböző szintetikus szteroidok összetevőkre specifikus anti-testeket tartalmaznak immobilizált formában. Egy kompetitív kemilumineszcens immunoassay-t használnak a szintetikus szteroidok szűrése során. Egy mintában lévő magasabb szintetikus szteroid szintek a torma peroxidázzal jelölt antimikrobák (HPR) alacsonyabb szintű megkötéséhez vezet, így a kibocsátott kemilumineszcencia csökkenése mutatkozik.

A biochip egyes teszterületeiről kibocsátott fényjelet digitális képalkotási technológiával mutatják ki, és egy tárolt kalibrációs görbével hasonlítják össze. A mintában jelenlévő analit koncentrációját a kalibrációs görbéből számítják ki.

Számos különböző immunoassay alapú multi-analitikus módszert fejlesztettek ki az Evidence Investigator™-on való használatra. Az Evidence Investigator Szintetikus szteroid vizsgálat kvantitatív módon tesztel egyidejűleg Methyltestosteron, 17β-Clostebol, Gestagen és Ethinylestradiol szteroidokra.

#### KORLÁTOZÁSOK

- A készletek összetevői árutétel (batch) specifikusak és vonalkódhoz vannak társítva. Ne keverje a különböző lotok alkotórészeit.
- Ez a készlet csak szűrésre használatos, nem diagnózisra.

- Az extrahált minták egész éjszakán át tartó tárolása csökkenti az Ethinylestradiol kimutathatóságát.

### MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A vizeletmintákat dekonjugálásnak kell alávetni és a kivont mintákat kell alkalmazni az Evidence Investigator™ Szintetikus szteroidok vizsgálat során.

- **1. lépés: Dekonjugáció  $\beta$ -Glucuronidase enzimmel.**

- I. Centrifugálja a vizelet mintát 4000 rpm-en 10 percig, így analízis előtt eltávolítható minden szemcsés anyag a mintából, amely zavarhatja a tesztet.
- II. Tegyen 5 ml centrifugált mintát egy külön edénybe. Adjon hozzá 5000 egység  $\beta$ -Glucuronidase-t (patella vulgata) tartalmazó 1 ml ddH<sub>2</sub>O-t.
- III. Állítsuk be a pH értéket 4,8 – 5,2 közé 1M-os sósav oldattal és inkubáljuk +37°C-on 2 órán át vízfürdőben.
- IV. Hagyjuk a mintát szobahőmérsékletre kerülni és állítsuk be újra a pH értéket 7,5 – 8,5 közé 1M-os Nátrium-hidroxid oldattal.
- V. Hígítsuk a mintát 10 ml-re ddH<sub>2</sub>O-vel.
- VI. Centrifugáljuk a mintát 4000 rpm-en 15 percig +25°C-on.

- **2. lépés: Minta extrakció C18 szilárd fázisú tisztítás.**

- I. Mossuk elő a C18-as oszlopot 3 ml 100% metanollal.
- II. Kondicionáljuk a C18-as oszlopokat 3 ml ddH<sub>2</sub>O-zel.
- III. Adjunk 2 ml az 1-es lépésben dekonjugált mintából.
- IV. Mossuk a C18-as oszlopot 2 ml 20%-os acetonitril- ddH<sub>2</sub>O oldattal.
- V. Szárítsa le a C18-as oszlopot vákuum alatt 15 perc alatt.
- VI. Eluáljuk a Szintetikus szteroidokat 3 ml 100%-os metanollal. (Folytassa azonnal a (vii) ponttal, vagy tárolja +2-+8°C-on egész éjszaka.
- VII. Pároljuk szárazra a mintát +60°C-on.
- VIII. 0,5 ml szintetikus szteroid minta hígítóval hozzunk létre szuszpenziót.

- Folytatva a tisztítási lépést, hígítsuk a vizelet mintát 10-szeresére a dobozban található minta hígítóval; 50  $\mu$ l+450  $\mu$ l. A hígított minta már alkalmas arra, hogy felvigyük a biochip-re.
- Mivel a teljes hígítási faktor vizeletminták esetében 5, a minta bevitel esetében 5 hígítási faktort kellene megadni.

### MINTA TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

- Ha a minta nem kerül azonnali vizsgálatra, -20 °C-on fagyasztva tárolható kisebb részekben. Ismételt fagyasztást/olvadást el kell kerülni.

### BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK, FIGYELMEZTETÉSEK

- Ne pipettázzon szájjal és tartsa be a laboratóriumi reagensek kezelésével kapcsolatos biztonsági szabályokat.
- Tároló edényeket és csöveket megfelelő azonosításuk érdekében feliratozni szükséges.

Az Egészségügyi és Biztonsági Adatlap kérésre beszerezhető.

**A reagenseket csak a rendeltetésnek megfelelően kell használni megfelelően képzett laboratóriumi személyzettel, megfelelő laboratóriumi körülmények között.**

#### REAGENS ÖSSZETÉTEL

##### 1. SYN STR DIL ASY

MOPS puffer 8.0 pH-jú, fehérjét, felületaktív anyagot, és tartósítószeret tartalmaz.

##### 2. SYN STR CONJ (conc.)

Fagyasztva szárított anyag, amely torna peroxidázzal (HRP) jelölt vizsgálat specifikus konjugátumokat tartalmazó puffer. pH 7,2

##### 3. SYN STR DIL CONJ

MOPS puffer 8.0 pH-jú, felületaktív anyagot, és tartósítószeret tartalmaz.

##### 4. SYN STR BIOCHIP

Megkötött ellenanyagokból álló, különálló teszterületeket tartalmazó szilárdtest szubsztrát.

##### 5. SYN STR CAL

9 flakon, a teljes panelre analitokat tartalmazó fagyasztva szárított alapanyag.

##### 6. SYN STR DIL SPE

20mM TRIS puffer alapanyagú fehérjét, felületaktív anyagot, és tartósítószeret tartalmaz.

##### 7. LUM-EV841 / PX

LUM-EV841 (1 x 10 ml) és Peroxid (1 x 10 ml) van biztosítva, és ha 1:1 arányban vannak keverve, akkor alkotják a működő jelreagenst.

##### 8. BUF WASH (conc.)

7.4 pH-jú, felületaktív anyagokat és tartósítószeret tartalmazó 20mM TRIS pufferolt sóoldat. Ne használjuk, ha a puffer kocsonyás vagy kristályos. További tanácsért forduljon a Randox technikai tanácsadáshoz.

#### A REAGENSEK STABILITÁSA ÉS ELŐKÉSZÍTÉSE

**Jegyezzük meg, hogy minden reagenst szobahőmérsékletre kell hozni felhasználás előtt.**

##### 1. SYN STR DIL ASY (Assay puffer)

A vizsgálati pufferoldat használatra kész, és +2 - +8°C-on tárolva a lejárat dátumig stabil, **fénytől védeni kell.**

##### 2. SYN STR CONJUGATE (conc.)

A konjugátum 100X-os koncentrációban van szállítva és +2 - +8°C-on tárolva a lejárat dátumig stabil, **fénytől védeni kell.**

A szükséges munka konjugátum készítésénél keverjen össze 10 µl konjugát koncentrátumot 990 µl konjugát hígító oldattal. Egy hordozónak (9 biochip + holtterfogó) körülbelül 1ml munka konjugátumra van szüksége. Teljes kitt, 6 hordozó esetében 60 µl koncentrátum szükséges 5940 µl konjugát hígítóhoz a megfelelő működéshez.

A munka erősségű konjugát 24 óráig stabil.

##### 3. SYN STR DIL CONJ (konjugátum oldószer)

A **konjugátum oldószer** használatra kész és stabil a lejárat időig, ha +2 - +8°C-on, **fénytől védve** tároljuk.

##### 4. SYN STR BIOCHIP

A biochipek használatra készek. Mindegyik hordozó 9 biochipet tartalmaz, és egy fogantyúval van ellátva a kezelés megkönnyítése érdekében. A hordozók egyedileg fóliába vannak csomagolva. A biochipek stabilak a lejárat időig, ha +2 - +8°C-on, **fénytől védve** tároljuk őket.

**5. SYN STR CAL (kalibrátor)**

A kalibrátorok fagyasztva szárított formában kerülnek forgalomba. Óvatosan nyissuk ki a flakont, hogy ne vesszen kárba az anyag. Oldjuk fel pontosan 1 ml ioncserélt vízben. Helyezzük vissza a gumidugót, zárjuk le a flakont és használat előtt 30 percig görgessük rolleres keverőn. Kerülje a habképződést.

A feloldott kalibrátorok az eredeti fiolában 3 napig stabilak +2 – +8°C-on vagy 14 napig -20°C-on. Csak a szükséges anyagmennyiséget vegyük ki. Az anyagot ne tegyük vissza az eredeti flakonba.

**6. SYN STR DIL SPE**

A minta hígító oldat használatra kész és stabil a lejárati időig, ha +2 - +8°C-on, fénytől védve tároljuk.

**7. LUM - EV841 / PX**

Két komponens, a Luminol-EV805 (1 x 10ml) és a Peroxid (1 x 10ml) van mellékelve, és ha 1:1 arányban vannak elkeverve, akkor adják a **munka jelreagenst**. Egy hordozóhoz (9 küvetta + holtterefogat) körülbelül 3 ml munka jelreagensre van szükség.

Számoljuk ki a szükséges munka jelreagens mennyiségét a 250 µl küvettánkénti térfogat alapján. Pl. 2 hordozó 6 ml munka jelreagenst igényel - 3 ml Luminol-EV841-et és 3 ml peroxidot. Mérjük ki mindkét komponens térfogatát (1:1) és aliquot, steril eldobható műanyag pipettákat használva, külön tiszta áttetsző csőbe. Ügyeljünk a szennyeződések elkerülésére a reagensek kezelése közben. Keverjük össze a komponenseket, gyengéden görgetve használat előtt 15 percig. Az állag elérése érdekében ajánlatos a Luminol-EV841 komponenst keveréskor a peroxid komponenshez adni. A Luminol-EV841 komponenst és munka jelreagenst fénytől védjük. A munka jelreagens szobahőmérsékleten 4 órán át stabil.

**7. BUF WASH (conc.)**

A mosópuffer koncentrátumként van mellékelve, amely használat előtt hígítást igényel. A hígítási faktor 31.25, vagyis 32 ml koncentrátumot kell 968 ml vízhez adni, és forgatással keverni. A **hígított mosópuffer** 30 napig stabil, ha +2°C - +8°C-on tároljuk.

**VIZSGÁLATI ELJÁRÁS****MELLÉKELT ANYAGOK**

1. SYN STR DIL AS	1 x 8ml
2. SYN STR CONJ (conc.)	1 x 750 µl
3. SYN STR DIL CONJ	1 x 8 ml
4. SYN STR BIOCHIP	54 biochips
5. SYN STR CAL	9 x 1 ml
6. SYN STR DIL SPE	2x30 ml
7. PX	1 x 10 ml
LUM - EV805	1 x 10 ml
8. BUF WASH (conc.)	1 x 32 ml
10. Kalibráló lemez és vonalkódok	1

**SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ANYAGOK**

1. Szintetikus szteroidok kontrol (EV3709)
2. Evidence Investigator™ Ziplock tasakok (EV3664)
3. Glucuronidase-t (patella vulgata) (Sigma G-8132)
4. 1M sósav
5. 1M nátrium-hidroxid
6. metanol
7. acetonitril
8. deionizált desztillált víz
9. C18 szilárd fázisú tisztító oszlop ( Phenomenex 8B-S001-FBJ)
10. centrifuga
11. pH mérő
12. vízfürdő
13. szilárd fázisú vákuum manifold
14. vortex
15. turbovap
16. Pipetták és pipetta csúcsok
17. Mosóüveg

### **KALIBRÁCIÓ**

Egy kilenc pontos kalibrációt kell végeznünk a Randox Evidence Investigator™ szintetikus szteroidok kalibrátorok használatával, amely a vizsgálat kalibrációját lefedi minden assay-re vonatkozóan. Maximum 6 biochip hordozó vizsgálható egyidejűleg, és ajánlatos mindegyik vizsgálat sorozathoz új kalibrációs görbét szerkeszteni.

### **MINŐSÉGI ELLENŐRZÉS**

A Randox szintetikus szteroidok (EV3709) kontrollokkal ajánlatos a minőségellenőrzés a pontosság és a precizitás nyomon követésére használni. A kontrol vizsgálatokat a felhasználó által meghatározott időtartamok szerint kell elvégezni.

### **ANYAGOK**

**Használat előtt minden anyagot szobahőmérsékletre kell hozni.**

Vegyük ki a kívánt számú biochip hordozót a csomagolásukból. Helyezzük az Investigator keverőinkubátor egységgel felszerelt kezelőtálcát a munkafelületre. Helyezzük be mindegyik hordozót a kezelőtálcába, a pozícióba pattintással biztosítva, hogy vízszintesek és rögzítettek. Minden minta és reagens hozzáadást, mosást és inkubációt a kezelőtálcá segítségével végzünk el, és a hordozókat csak az eljárás végső jelzőanyag hozzáadás és képkötés fázisához távolítjuk el róla. További részleteket lásd a Használati utasításban. Minden használandó hordozót címkézzünk fel. Ajánlott, hogy az első vizsgálandó hordozó kalibráció legyen, a mellékelt kilenc kalibrátor használatával. Ajánlatos a keverőinkubátort használat előtt 30 perccel 30°C-ra melegíteni.

**Ajánlott, hogy ezt a vizsgálatot egy laboratóriumban + 15 - +25°C közötti hőmérsékleten végezzük el. Ha olyan laboratóriumban dolgozunk, amely ezeken a hőmérsékleteken kívül esik, az kedvezőtlen hatással lehet a teljesítményre.**

### **ELJÁRÁS**

#### **CD-ROM INSTALLÁCIÓ**

- Helyezzük a lemezt a CD-ROM meghajtóba.
- Az Updater program automatikusan futni fog.
- Kattintsunk arra a rendszerre, amelyet frissíteni akarunk, hogy biztosítsuk, hogy a megfelelő módszer van frissítve a szoftveren a koncentráció feltöltése előtt.
- Zárjuk be a feltöltés panelt és a Koncentráció Frissítése (Update Concentration) ablak fog megjelenni.
- Válaszoljunk igennel (YES) a 'Biztos abban, hogy, frissíteni kívánja a koncentrációkat?' (ARE YOU SURE YOU WANT TO UPDATE CONCENTRATIONS?) kérdésre.
- A PDF megtekinthető, ha megnyitjuk a My Computer-t (Sajátgép) és kiválasztjuk az explore-t (kutatás) a CDROM-on.
- A kalibrációs koncentrációk ehhez a panelhez most frissítve lettek. Kérjük, kalibrálja újra a társított módszert a további mintaanalízis előtt.

#### **KÜLÖNLEGES UTASÍTÁSOK**

A Módszer (Array) és a Kalibrátor (Calibrator) beállítások alapvető frissítések az ön Evidence Investigator™ rendszeréhez, és a megfelelő Evidence Investigator™ kalibrátorokkal együtt történő használatra kell őket installálni.

#### **ASSAY PROTOCOL/MÓDSZER PROTOCOL**

A kézi Evidence Investigator™ szintetikus szteroidok módszerekhez a kiértékelt hordozók maximális száma bármely adott időpontban a reagens / minta berakási időtől függ. Ajánlott, hogy ez az időtartam ne haladjon meg a 10 perccel.

A reagensek hozzáadása pipettázással történik a biochip elejéhez, ügyelve, hogy a biochip felületét ne érintsük meg a pipettacsúcsokkal (lásd az alábbi ábrát).

1. Pipettázzunk **100 µl assay puffert** minden chip-re.
2. Pipettázzunk **100 µl kalibrátort/előkészített mintát** minden chip-re. (MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS-ben olvashat a minták megfelelő előkészítéséről). Keverje össze a kezelőtálca sarkainak gyengéd ütögetésével.
3. Rögzítsük a kezelőtálcát a keverőinkubátor alaplapjához. Inkubáljuk 30 percig +30°C-on és 370 rpm-en.
4. Pipettázzunk **100 µl munka konjugátumot** küvettánként. Inkubáljuk további 60 percig +30°C-on és 370 rpm-en.
5. Vegyük ki a hordozókat tartalmazó kezelőtálcát a keverőinkubátorból. Öntsük ki a reagenseket a hulladékba a kezelőtálca hirtelen megbillentésével.
6. Azonnal végezzünk el 2 gyors mosóciklust. Hígított mosópuffert tartalmazó mosóüveget használva (a hígítást lásd a készlet mellékletében) adjunk kb. **350 µl mosópuffert** mindegyik küvettába, és hirtelen mozdulattal öntsük a hulladékba. Ügyeljünk rá, hogy a mosás során ne töltsük túl a küvettákat annak érdekében, hogy csökkentsük a küvettáról küvettára történő szennyeződés lehetőségét. Végezzünk el még 4x 2 perc mosóciklust; Minden két perces mosó ciklusnál az alábbiakra kell figyelni: Amikor a mosó puffert hozzáadtuk a küvettákba kb 30-40 másodpercig erőteljesen ütögezzük, majd hagyjuk biochipeket ázni a mosópufferben az utolsó 10 másodpercig. Az utolsó 10 másodpercben újabb erőteljes ütögetés következik. Aztán egy hirtelen mozdulattal öntsük a hulladékba a mosópuffert és ismételjük meg ezeket a lépéseket még 3 mosó ciklus alkalmával.
7. Az utolsó mosás után töltsük fel a küvettákat mosópufferrel, és hagyjuk ázni közvetlenül a képkotásig. Ne tartson tovább 30 percnél az áztatás.

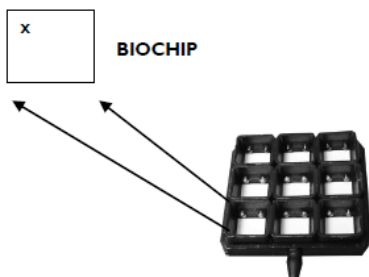
## KÉPALKOTÁS

Lásd az Evidence Investigator™ Kezelői Utasítás 1.3 bekezdését az általános működési eljárásra és a munkalistára vonatkozóan.

- A hordozókat egyenként dolgozzuk fel. Azokat, amelyek a képkotásra várnak, óvnunk kell a fénytől.
- Vegyük ki az első képkotásra váró hordozót a kezelő tálcáról. Közvetlenül a jelző reagens hozzáadása előtt távolítsuk el a mosópuffert egy gyors, billentő mozdulattal, és ütögezzük ki a hordozót egy szöszmentes törülközőre az összes maradék mosópuffer eltávolítása érdekében.
- Adjunk 250 µl munka jelreagenst mindegyik küvettába, és fedjük le, hogy megvédjük a fénytől.
- Pontosan 2 perc múlva (±10 mp) helyezzük a hordozót az Evidence Investigator™-be. Ajánlatos egy időzítő használata, hogy a képkotás a megfelelő időben történjen.
- A képek készítése automatikusan indul, ahogyan a társított szoftver által meg van határozva. (Lásd a Szoftver Kézikönyvet/Software Manual).

## EREDMÉNYFELDOLGOZÁS

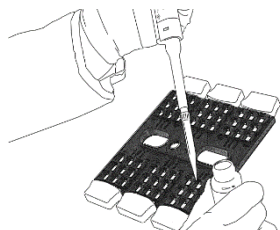
Az eredmények automatikusan kerülnek felhasználásra a társított szoftver használatával.



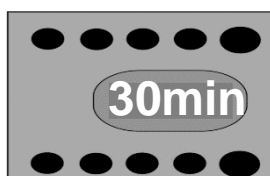
Minta és reagens felvitel helyes pontja biochipenként.

Az Evidence Investigator™ a Randox Laboratories Ltd. Northern Ireland védjegye.

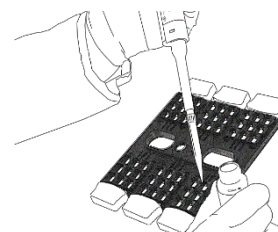
## Szintetikus szteroidok (EV3694) vizsgálati eljárás összefoglalója (Kérjük, figyelmesen olvassa el a teljes protokoll leírást!)



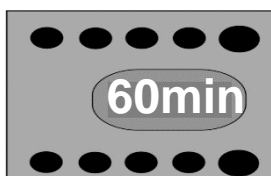
1. Adjon 100 µl assay hígító oldatot minden küvettába, 2. majd ezt kövesse 100 µl standard/előkészített minta/kontrol



3. Inkubáljuk a hordozót +30°C-on 30 percig 370 rpm-en.



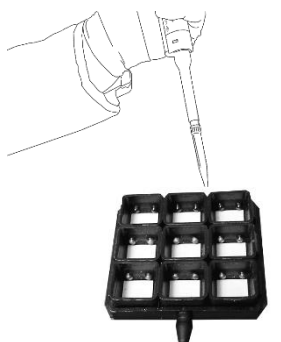
4. Adjunk hozzá 100 µl munka konjugátumot



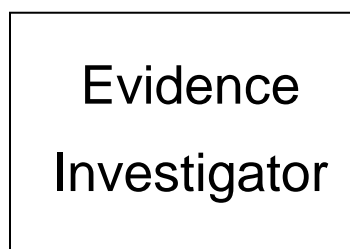
5. Inkubáljuk a hordozót +30°C-on 60 percig 370 rpm-en.



6. Öntsük le a folyadékot és jól mossuk el az összes küvettát a hígított mosópufferrel. Végezzünk el 2 gyors mosást és 4 kétperces áztatást. Öntsük ki a folyadékot és ütögessük szőszmentes papírra.



7. Öntsük ki a folyadékot és ütögessük szőszmentes papírra Adjunk 250 µl **jelreagenst** (luminol-EV841 & peroxide (1:1)) mindegyik küvettába. Inkubáljuk 2 percig és óvjuk a fénytől.



8. Alkossunk képet mindegyik hordozóról az Investigatoron.