



НАБОР ИФА для определения СВОБОДНОГО ЭСТРИОЛА

Кат. № : EIA-1612
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 08-2011
Версия 9.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение к использованию

Набор DRG Free Estriol ELISA является иммуноферментным анализом для количественного определения в диагностике *in vitro* свободного эстриола (неконъюгированного эстриола) в сыворотке во время второй половины беременности.

1.2 Краткое описание и объяснение

Эстриол (Е3) - наибольший эстроген, вырабатываемый плацентой плода во время беременности.

Неконъюгированный Е3 через плаценту попадает в кровь матери, где быстро конвертируется в глюкоронид и сульфатные дериваты, что способствует его экскреции.

Период полужизни Е3 в крови матери только 20-30 минут. Так что, его измерение требует удобной и быстрой технологии, чтобы оценить текущее состояние плода.

Уровни эстриола увеличиваются в плазме во время всей беременности, но особенно в третий триместр (28-40 неделя).

Резкое уменьшение продукции Е3 плацентой плода проявится быстрым падением уровня неконъюгированного Е3 в сыворотке матери.

Измерения неконъюгированного Е3 по сравнению с измерением тотального или Е3 в моче дает несколько существенных преимуществ.

Уровни неконъюгированного Е3 не зависят от наличия у матери заболеваний печени или почек и назначение некоторых антибиотиков на них также не влияет. Уровень неконъюгированного Е3 точно отображает исход у беременных с сахарным диабетом, а это значит, что не требуется проведения реакции гидролиза неконъюгированного Е3 и результаты теста можно получить быстрее.

Для измерения неконъюгированного Е3 в неэкстрагированной сыворотке набор предоставляет неизотопный метод. В этом методе используются высоко специфическое эстриоловое антитело и маркированный ферментом аналит. Цветной конечный продукт можно измерять на фотометре. Длительный период полужизни этого продукта вместе с отсутствием радиоизотопов, что требует лицензированной аппаратуры, делает этот метод пригодным для больших и малых лабораторий.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG Free Estriol ELISA является твердофазным ферментно-связанным анализом, основанный на принципе конкурентного связывания.

Сыворотка с эстриолом (то есть стандарт или образец пациента) смешивается с ферментным конъюгатом и добавляется в лунки. Эстриоловое антитело уже предварительно нанесено на дно лунок. После 1 часа инкубации свободная эстриол-щелочная фосфатаза вымывается буфером. К антитело-связанной эстриол-щелочной фосфатазе, что иммобилизовано в лунках, добавляется субстрат. После короткой инкубации добавляется стоп раствор, что дает образование цветного продукта, интенсивность которого измеряют на фотометре.

3. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ и ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Для диагностики *in vitro*.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма исследовании иррадируются методом,

EIA-1612, Free Estriol ELISA

утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.

- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные исследованиевые результаты при использовании калиброванных пипеток.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Лист данных безопасности доступен по требованию.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

- Микротитрационные лунки**, 12x8 стрипов, 96 лунок. Лунки покрыты анти-эстриол поликлональным антителом.
- Стандарт (стандарт 0-6)**, 6 фл., 1 мл, готовый к использованию. Концентрации: 0, 0,3, 1,2, 4,0, 15, 40 нг/мл.
- Ферментный конъюгат**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию. Эстриол, конъюгированный пероксидазой хрена.
- Раствор субстрата** 1 фл., 14 мл, готовый к использованию тетраметилбензидин (ТМБ).
- Стоп-раствор**, 1 фл., 14 мл, готовый к использованию 0,5M H₂SO₄. Избегайте контакта со стоп-раствором. Он может вызвать раздражения и ожоги.
- Промывочный раствор (40x)**, 1 фл., 30 мл. См. «Подготовка реагентов».

Примечание: Дополнительный 0 стандарт для разбавления образца доступен по запросу.

4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм (± 10 нм).
- Калиброванные точные пипетки.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

4.3 Условия хранения

При хранении при 2-8°C неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микропланшет необходимо хранить при 2-8°C. После открытия пакета из фольги необходимо быть внимательным, чтобы снова его закрыть.

Открытые наборы сохраняют активность в течении 2 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

4.4 Приготовление реагентов

Приведите все реагенты и требуемое количество стрипов перед использованием к комнатной температуре.

Промывочный раствор

Добавить деионизированной воды к x40 концентрированному промывочному раствору.

Разбавить 30 мл концентрированного промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды, чтобы достичь конечного объема 1200

мл. Разбавленный промывочный буфер стабилен 2 недели при комнатной температуре.

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо проводить согласно местных требований. Специальная информация для данного продукта указана в паспорте безопасности.

4.6 Повреждение набора

При значительном повреждении набора или компонентов, необходимо уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

5. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться сыворотка.

Не используйте для анализа гемолизированные, иктерические и липемические пробы.

Примечание: в анализе не должны использоваться образцы, содержащие азид натрия.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания крови. Пациентам, проходящим терапию антикоагулянтами, может потребоваться больше времени для свертывания.

5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрытыми и могут храниться до 4 дней при 2-8°C.

Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить 0 стандартом и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

Например:

- Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);
- Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Общие замечания

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала исследования все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом исследования, чтобы не тратить время во время самого исследования.
- В основном ферментативная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

6.2 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

В каждой процедуре должна быть включена калибровочная кривая.

1. Установите нужное количество микролунок в держатель рамки.
2. Пипеткой внесите по **10 мкл** каждого из стандартов, контролей и образцов, используя новые наконечники, в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте по **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку планшета. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **60 минут** при комнатной температуре (не накрывая планшет).
5. Вытряхните содержимое лунок.

Промойте разведенным промывочным раствором три раза (**400 мкл** на лунку). Резко встряхните планшетом над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

Важное замечание: Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!

6. Добавьте по **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте по **100 мкл** стоп-реагента в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп-раствора.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить или принимать как > нг/мл. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Пример типичной калибровочной кривой

Последующие данные приведены с целью демонстрации и **не могут** использоваться вместо данных, полученных во время анализа.

Стандарт		Оптич. единицы (450 нм)
Стандарт 0	0 нг/мл	1,79
Стандарт 1	0,3 нг/мл	1,48
Стандарт 2	1,2 нг/мл	1,18
Стандарт 3	4,0 нг/мл	0,81
Стандарт 4	15,0 нг/мл	0,52
Стандарт 5	40,0 нг/мл	0,38

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая

Неделя беременности	Ожидаемые границы нг/мл	Неделя беременности	Ожидаемые границы нг/мл	Двойня нг/мл
12	0,3-1,0	22-23	2,7-16	3-18
13	0,3-1,1	24-25	2,9-17	3-20
14	0,4-1,6	26-27	3,0-18	4-21
15	1,0-4,4	28-29	3,2-20	4-22
16	1,4-6,5	30-31	3,6-22	5-25
17	1,5-6,6	32-33	4,6-23	6-39
18	1,6-8,5	34-35	5,1-25	7-39
19	1,9-11	36-37	7,2-29	9-38
20	2,1-13	38-39	7,8-37	13-40
21	2,6-14	40-42	8,0-38	---

КЛИНИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

1. Измерение Эстриола (Е3) в жидкостях тела рутинно используется для мониторинга состояния плода, особенно у пациентов с высоким риском невынашивания.
2. Концентрация Е3 в плазме постепенно растет в первые 20 недель беременности и более быстро в третий триместр.
3. Поскольку границы нормы и патологии достаточно широки,

однократное измерение ЕЗ не имеет большой информативности. Для определения индивидуальных колебаний необходимо как раз мониторинг.

- Постоянные низкие уровни или резкое и прогрессирующее падение уровня ЕЗ во время 3 триместра беременности указывают на дистресс плода и возможную его внутриматочную смерть.
- Когда сделаны подобные наблюдения, предположение должно быть проверено альтернативными методами.
- Интерпретация уровней неконъюгированного ЕЗ должна проводиться вместе с другими клиническими методами исследования, такими как амниоцентез и ультразвуковое исследование.
- Субнормальные уровни ЕЗ часто определяются у пациентов, которые принимают некоторые антибиотики или кортикостероиды, а также у пациентов с патологией печени.

ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Ниже поданные данные только для демонстрации и не могут быть использованы в качестве результатов теста.

Стандарты	Оптические единицы
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1,79
Стандарт 1 (0,3 нг/мл)	1,48
Стандарт 2 (1,2 нг/мл)	1,18
Стандарт 3 (4,0 нг/мл)	0,81
Стандарт 4 (15,00 нг/мл)	0,52
Стандарт 5 (40,00 нг/мл)	0,38

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

1. Чувствительность

Минимально определенная чувствительность Эстриола свободного составляет $\leq 0,075$ нг/мл.

2. Специфичность

Специфичность данного набора была протестирована согласно методу Абрагама.

Стероид	Концентрация стероида	ОП 450	Измеренная концентрация
Эстриол (ЕЗ)	40 нг/мл	0,39	39,67 нг/мл
Тестостерон	16 нг/мл	1,758	—
Эстрадиол (Е2)	2 нг/мл	1,579	—
Эстрон (Е1)	2 нг/мл	1,712	—
Кортизол	800 м	1,775	—

3. Точность

Вариация внутри теста

Сыворотка	Кол-во копий	Средн. нг/мл	КВ, %
1	20	2,1	4,7
2	20	6,2	3,2
3	20	14,58	3,0

Вариация между тестами

Сыворотка	Кол-во копий	Средн. нг/мл	КВ, %
1	12	2,1	4,6
2	12	5,7	8,5
3	12	13,3	9,5

4. Извлечение

Точность теста была установлена тестом на извлечение и разведение.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация нг/мл	1,3	3,6	7,8
Средн. извлечение	100,8	101,8	106,9
Диапазон от	89,0	92,3	98,5
извлечения, % до	103,8	109,8	112,3

1. Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация нг/мл	2,6	7,2	15,6
Средн. извлечение	98,2	99,7	100,2
Диапазон от	86,3	90,4	96,4
извлечения, % до	107,9	106,8	103,7

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Лабораторная практика требует, чтобы контроли тестировались для

каждой калибровочной кривой. Необходимо точное количество контролей для установления средних значений и приемлемых границ для проверки характеристик набора.

Мы рекомендуем использовать BIO RAD Lyphochek Immunoassay Control Sera, что предлагается DRG.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua