

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЭСТРАДИОЛА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ
ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

2046-18, Estradiol

Каталог. № : 2046-18

Методика от 10-10-2009

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	Estradiol (E2) ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой: нанесенный антиген
Диапазон обнаружения	0-1000 пг/мл
Образец	25 мкл сыворотки
Специфичность	100 %
Чувствительность	10 пг/мл
Общее время	~ 110 мин.
Срок годности	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения эстрадиола в сыворотке человека.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Эстрадиол ИФА основывается на принципе конкурентоспособного связывания между эстрадиолом в анализируемом образце и эстрадиол-HRP конъюгатом, в стабильном количестве анти-эстрадиола кролика. В процессе инкубации лунки, покрытые козлиным анти-кроличьим IgG инкубируются при комнатной температуре (18-25°C) в течении 90 минут с 25 мкл стандартов эстрадиола, контролями, образцами пациентов, 100 мкл реагента эстрадиол-HRP конъюгата 50 мкл реагента анти-эстрадиола кролика. В течение инкубации, закрепленное количество HRP-меченого эстрадиола конкурирует с эндогенным эстрадиолом в стандарте, образце, или сыворотке контроля качества на определенных местах связывания специфичного антитела эстрадиола. Таким образом, количество конъюгата пероксидазы эстрадиола, иммунологически связанного с лункой, интенсивно уменьшается, так как концентрация эстрадиола в образце увеличивается. Затем несвязанный конъюгат пероксидазы эстрадиола удаляется и лунки промываются. Затем, добавляется раствор ТМБ реагента и инкубируется при комнатной температуре в течении 20 минут, приводя к образованию синего цвета. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, и абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна количеству присутствующего фермента, и противоположна количеству непомяченного эстрадиола в образце. Калибровочная кривая получается путем составления графика концентрации стандарта против меры поглощения света. Концентрация эстрадиола в образцах и контролях, анализируемая одновременно со стандартами может быть рассчитана от калибровочной кривой.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые в наборе материалы:

- Козлиные анти-кроличьи IgG-покрытые микротитровальные лунки, 96 лунок.
- Референтные стандарты эстрадиола: 0, 10, 30, 100, 300 и 1000 пг/мл. Жидкие, по 0,5 мл каждый, готовые к использованию.
- Реагент кроличьего анти-эстрадиола (розового цвета), 7 мл.
- Реагента эстрадиол-HRP конъюгата (синего цвета), 12 мл.
- Эстрадиол контроль 1, жидкий, 0,5 мл, готовый к использованию.
- Эстрадиол контроль 2, жидкий, 0,5 мл, готовый к использованию.
- Реагент ТМБ (одноэтапный), 11 мл.
- Стоп-раствор (1N HCl), 11 мл.

Требуемые, но не поставляемые материалы:

- Точные пипетки: 25, 50, 100, 200 мкл и 1,0 мл.

- Одноразовые наконечники для пипеток.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Вихревой смеситель (вортекс) или его аналог.
- Абсорбирующая бумага или бумажное полотенце.
- Миллиметровая бумага.
- Микротитрационный планшетный считыватель.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Не существует методик, дающих полную гарантию отсутствия вируса гепатита В, ВИЧ/ЛАВ, или других инфекционных агентов в реагентах набора. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы пациентов, должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

ЗАБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Для анализа должна использоваться только сыворотка человека.
2. Образцы не нуждаются в специальной предварительной обработке.
3. Образцы сыворотки могут храниться до 24 часов при 2-8 °C и должны замораживаться при -10 °C или ниже при более длительном хранении. Не используйте высокогемолизированные или липемические образцы.
4. **Примечание:** не должны использоваться образцы, содержащие азид натрия.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Не вскрытые наборы должны храниться после из получения при 2-8 °C и микротитрационный планшет должны содержаться в герметичном пакете с осушителями, чтобы минимизировать влияние влажного воздуха. Открытые наборы будут сохранять свою активность до окончания срока годности при соблюдении вышеуказанных условий хранения. Микротитрационный планшетный считыватель с шириной световой дорожки 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-3 ОП при длине волны 450 нм подходит для использования измерения абсорбции.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Приведите все реагенты, которые будут использоваться к комнатной температуре (18-25 °C).
2. Образцы с ожидаемыми концентрациями эстрадиола более чем 1000 пг/мл могут быть проанализированы количественно путем разбавления разбавителем, располагаемым продавцом.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите в держателе желаемое количество покрытых лунок, которые будут использоваться.
2. Пипеткой внесите 25 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл реагента эстрадиол-HRP конъюгата в каждую лунку.
4. Распределите 50 мкл реагента кроличьего анти-эстрадиола в каждую лунку.
5. **Тщательно перемешайте в течении 30 сек. Очень важно полностью перемешать.**
6. Инкубируйте 90 минут при комнатной температуре (18-25 °C).
7. Промойте лунки дистиллированной или деионизированной водой 5 раз и встряхните их содержимое. (Не использовать проточную воду).
8. Внесите 100 мкл ТМБ реагента в каждую лунку. Осторожно перемешайте в течении 10 сек.
9. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре (18-25 °C).
10. Остановите реакцию путем добавления 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
11. Осторожно перемешайте в течении 30 сек. **Очень важно убедиться в том, что весь синий цвет стал полностью желтым.**
12. Измерьте абсорбцию при 450 нм с помощью микротитровального планшетного считывателя **в течении 15 минут.**

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите значение средней абсорбции (A_{450}) для каждого набора референтных стандартов, контролей и образцов.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации в пг/мл на **миллиметровой бумаге** при значениях абсорбции на оси Y и концентрациях на оси X.
3. Используя значения средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию эстрадиола в пг/мл на калибровочной кривой.
4. Любые значения, полученные от разбавленных образцов, должны быть в дальнейшем переведены при калькуляциях в значения с использованием соответствующего коэффициента разбавления.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной процедуры анализа стандарта, выполненного с чтениями оптической плотности при 450 нм показанный на Y оси против концентраций эстрадиола, показанных в оси X. **Примечание:** Эта калибровочная кривая предназначена только для иллюстрации, и не должна использоваться для вычисления неизвестных величин. Каждая лаборатория в каждом эксперименте должна разработать свои собственные данные и калибровочную кривую.

Эстрадиол (пг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	2,943
10	2,551
30	2,055
100	1,624
300	0,925
100	0,571

(График построения калибровочной кривой см. в оригинале инструкции).

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные значения нормы. Эстрадиол ИФА исследовался на клинических лабораторных образцах выборочных пациентов.

Мужчины:	< 60 пг/мл
Женщины: Фаза пост-менопаузы	< 18 пг/мл
овуляция, ранняя фолликулярная	30-100 пг/мл
поздняя фолликулярная	100-400 пг/мл
Лютеальная фаза	60-150 пг/мл
Беременные, в норме	до 35 000 пг/мл
Дети, в норме	< 10 пг/мл

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность

Минимально определяемая концентрация эстрадиола ИФА при измеренных 2 СО из среднего значения нулевого стандарта составила 10 пг/мл.

Точность

а. Точность в анализе

Точность в анализе была определена путем анализа репликатов 4 разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариативность в анализе указана ниже:

Образцы	1	2	3	4
К-во репликатов	24	24	24	24
Средн. эстрадиола (пг/мл)	13	73	247	633
СО	3	7	10	31
КВ (%)	24,1	10,3	4,1	4,9

б. Точность между анализами

Точность между анализами была определена путем анализа репликатов 6 разных образцов сыворотки в ряде отдельно откалиброванных анализов. Вариативность между анализами указана ниже:

Образцы	1	2	3	4
К-во репликатов	20	20	20	20
Средн. эстрадиола (пг/мл)	14	82	264	691
СО	4	8	17	45
КВ (%)	26,7	10,3	6,4	6,6

Исследование восстановления

Различные образцы сыворотки пациентов известных уровней эстрадиола были объединены или проанализированы в дубликаты. Среднее восстановление составило 93,3%.

№ пары	Ожидаемое (пг/мл)	Полученное (пг/мл)	% восстановления
1	580	599	103,3
2	810	733	90,4
3	280	249	89,2
4	265	285	107,5
5	81	91	112,6
6	62	67	107,3
7	18	18	98,7

Специфичность

Следующие вещества были проверены на перекрестную реактивность. Процент указывает на перекрестную реактивность при смещении 50 % по сравнению с эстрадиолом.

Данные относительно перекрестной реактивности для нескольких эндогенных и фармацевтических стероидов обобщены в следующей таблице:

$$\text{Перекрестн. реактивность (\%)} = \frac{\text{Полученная концентрация эстрадиола} \times 100}{\text{Концентрация стероида}}$$

Стероид	Перекрестная реактивность
Эстрадиол	100%
Эстрон	2,10%
Эстриол	1,50%
17 α Эстрадиол	0,30%
Кортизол	<0,01%
Кортизон	<0,01%
Прогестерон	<0,01%
Тестостерон	<0,01%
ДГЕА-Сульфат	<0,01%
5 α -Дигидротестостерон	<0,01%

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1. Оценка менструальных дисфункций у женщин

- Гиперэстрогенизм у девочек

Повышенное количество эстрадиола может использоваться для оценки преждевременной половой зрелости у девочек. Однако для определения конкретного диагноза требуются вспомогательные средства.

- Гипоэстрогенизм у женщин

Измерения эстрадиола часто применяются в оценке гипозэстрогенизма в случае задержки достижения половой зрелости, первичной и вторичной аменореи и менопаузы. При гипоэстрогенизме концентрации эстрогена составляют как правило < 30 пг/мл.

2. Оценка чрезмерного вырабатывания эстрогена у женщин

В беременных женщин концентрации эстрогена будут составлять > 1000 пг/мл. В небеременных женщин избыток эстрогена может указывать на новообразования в яичниках.

3. Наблюдение за овуляцией

Эстрадиол часто измеряется для мониторинга индукции овуляции и как сопутствующее исследование во время терапии бесплодия, например, фертилизации in vitro.

4. Измерение эстрадиола у мужчин

В мужчин определение эстрадиола используется для диагноза гинекомастии, феминизирующих синдромов, гипогонадизма и тестикулярных опухолей.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Достоверные и воспроизводимые результаты будут получены, когда процедура анализа выполнена с полным пониманием указаний вкладыша набора и при соблюдении квалифицированной лабораторной практики.
- Процедура промывки крайне важна. Недостаточная промывка приведет к неполной точности и ошибочно повышенным считываниям абсорбции.
- Не используйте в анализе сильно гемолизированные, липемические или мутные образцы.
- Результаты, полученные от использования этого набора должны использоваться только как дополнение к другим диагностическим процедурам и информации, располагаемой врачом.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Квалифицированная лабораторная практика требует, чтобы контроли использовались в каждой калибровочной кривой. Статистически важное количество контролей должно анализироваться, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, чтобы обеспечить соответствующую эффективность набора.

В качестве контроля рекомендуется использовать BIO-RAD LYPHOSNEK IMMUNOASSAY CONTROL SERA. Данный набор также поставляется с внутренними контролями, Уровень 1 и 2.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com