



**Инструкция
пользователя**



Эстриол Свободный ИФА

REF EIA-1612

Σ 96 лунок

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 ВВЕДЕНИЕ**1.1 Наименование и назначение**

Набор DRG эстриол свободный – иммуноферментный анализ (ИФА) для количественного определения in-vitro свободного эстриола в сыворотке человека во второй половине беременности.

1.2 Описание и объяснение теста

Эстриол (Е3) – главный эстроген, образуемый фетоплацентарной единицей. Неконъюгированный Е3 проходит сквозь плаценту в кровоток матери, где практически сразу переходит в производные: глюкуронид и сульфат – для усиления экскреции. Период полураспада эстриола в материнском кровотоке составляет лишь 20 – 30 минут. Его измерение позволяет быстро и удобно оценить состояние плода. Эстриол в плазме монотонно увеличивается в течение беременности, но особенно резко он растет в третьем триместре (28 – 40 недель). Внезапное понижение фетоплацентарной продукции Е3 приведет к резкому падению уровня Е3 в сыворотке матери. Есть несколько преимуществ измерения неконъюгированного Е3 перед измерением общего Е3 в моче или сыворотке. Уровень неконъюгированного эстриола не зависит эффектов, которые могут оказать на него печеночные или почечные дисфункции, и не изменяется от приема антибиотиков. Неконъюгированный Е3 более актуально отражает возможность выкидыша при беременности с диабетом. Так как не требуется гидролиза несвязанного Е3, то можно быстрее получить результат.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG эстриол свободный представляет собой иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на принципе конкурентного связывания.

Микротитровальные лунки покрыты поликлональными антителами (кроличьи) к антигенным сайтам на молекуле Эстриола. Эндогенный Эстриол из образца пациента конкурирует с пероксидазой хрена за связывание с антителами на поверхности микролунок. После инкубации несвязанный конъюгат вымывается. Количество связанной пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации Эстриола в образце. После внесения раствора субстрата увеличение интенсивности цвета обратно пропорционально концентрации Эстриола в образце.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования.
2. **Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно, сравните английскую инструкцию с русской, отдавая предпочтение английской и обращая особое внимание на состав набора и процедуру анализа. Убедитесь, что вам все понятно.**
3. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
4. Микротитровальный планшет содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
6. Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, т.к. это может привести к контаминации реагентов.
7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.

12. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
16. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
17. Избегайте контакта со стоп-раствором – 0,5M H₂SO₄. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты, входящие в набор

1. **Микротитровальная плашка**, 12 x 8 (делимые) стрипы, 96 лунок;
Лунки покрыты анти-Эстриол антителами (поликлональными)
2. **Стандарты (0 – 5)**, 6 флаконов, 1 мл, готовы к использованию.
Концентрации: 0 – 0,3 – 1,2 – 4 – 15 – 40 нг/мл.
3. **Контроли (Низкий и Высокий)**, 2 флакона, 1 мл каждый, готов к использованию,
Значения и диапазоны смотрите на этикетке флакона или паспорте качества.
Содержит безртутный консервант.
4. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию,
Эстриол, конъюгирован с пероксидазой хрена.
Содержит безртутный консервант.
5. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию.
Тетраметилбензидин (ТМБ)
6. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию,
Содержит 0,5 M H₂SO₄,
Избегайте контакта со стоп-раствором. Это может привести к повреждениям кожи и ожогам.
7. **Промывочный Раствор, 1 флакон, 30 мл (40X)**.
См. «Приготовление Реагентов»

Внимание: Дополнительный Нулевой Стандарт для разведения образцов доступен по запросу.

4.2 Дополнительные материалы и приборы:

- Микротитровальный ридер (450 ± 10 нм) (напр. Микротитровальный ридер DRG Instruments).
- Калибровочные микропипетки различного объема.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Таймер
- Бумага для построения кал.кривой или программное обеспечение для обработки данных

4.3 Хранение и стабильность реагентов

При хранении при 2° ÷ 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Открытые реагенты хранить при 2° ÷ 8°C. Микротитровальные лунки хранить при 2° ÷ 8°C. После использования части лунок необходимо хранить оставшиеся лунки в герметично закрытой упаковке. Иммунореактивность лунок сохраняется припл. 2 месяца в плотно закрытой упаковке с влагопоглотителем.

4.4 Приготовление реагентов

Перед использованием доведите все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Рабочий промывочный раствор

Добавьте деионизированную воду к 40х концентрату Промывочного раствора.

Смешайте 1170 мл дистиллированной воды и 30 мл концентрата промывочного раствора до конечного объема - 1200 мл.

Разведенный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности.

4.6 Повреждение Набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, DRG должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

5 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В этом исследовании может использоваться сыворотка.

Не использовать сильно гемолизированные, желтушные и липемические образцы.

Обратите внимание: образцы, содержащие азид натрия, не могут использоваться с этим набором.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венопункцией, дайте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

5.2 Хранение и Подготовка образцов

Образцы, закрытые крышками, могут храниться до 4 дней при 2 – 8 °C перед исследованием.

В случае более длительного промежутка времени до исследования образцы должны храниться при -20°C (до года). Перед исследованием размороженные образцы следует несколько раз перевернуть. Избегайте повторного замораживания / размораживания.

5.3 Разведение образцов

Если во время начального анализа обнаружили, что концентрация образца выше самого высокого стандарта, образец необходимо развести Нулевым Стандартом, и исследовать повторно согласно Процедуре Анализа.

Для расчета концентрации необходимо учитывать фактор разведения.

Например:

А) разведение 1:10 10 мкл сыворотки + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешайте)

Б) разведение 1:100 10 мкл. Разведенной сыворотки А) 1:10 + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешайте)

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры. Все реагенты должны быть смешаны без образования пены

- После начала процедуры, все шаги должны быть проведены без остановки.

- Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для дозатора для каждого стандарта, контроля и образца для предотвращения контаминации

- Абсорбция - это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять все крышки и закрепить необходимое количество стрипов в держателе. Это позволит придерживаться одинакового времени между пипетированием.

- Как обычно ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Необходимо строить калибровочную кривую для каждой постановки.

1. Отобрать необходимое количество стрипов/лунок и закрепить их в держателе.
 2. Внести **10 мкл** каждого Стандарта, Контроля и образца новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
 3. Добавить **100 мкл конъюгата** в каждую лунку. В течение 10 секунд аккуратно поворачивать планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.
 4. Инкубировать при комнатной температуре **1 час**.
 5. Быстро вытряхнуть содержимое лунок.
- Промыть **4 раза** разведенным Промывочным Буфером (400 мкл на каждую лунку) и выстучать оставшуюся жидкость на абсорбирующую бумагу.

Важно: Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

6. Добавить **100 мкл раствора субстрата** во все лунки.
7. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
8. Остановить ферментативную реакцию, добавив **100 мкл стоп-раствора** во все лунки.
9. Измерить оптическую плотность (ОП) при **450 ± 10 нм**. Рекомендуется проводить измерение в течение 10 минут после внесения стоп-раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Рассчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Построить стандартную кривую: отложить значения абсорбции каждого стандарта напротив их концентраций, абсорбции - на оси Y, концентрации - на оси X.
3. Используя среднее значение абсорбции образцов пациентов определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты данной инструкции были посчитаны с использованием подгонки кривой по 4-параметрической логистической функции (4 PL). Предпочтительные методы: 4-Parameter Rodbard или 4 Parameter Marquardt. Другие методы обработки данных могут дать отличный (от данного) результат.
5. Концентрации образцов можно считать прямо с данной стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем максимальный стандарт, необходимо разбавить или обозначить концентрацию как > 40 нг/мл. При подсчете результатов необходимо учитывать кратность разведения.

6.4 Пример стандартной кривой

Следующие данные приведены только для демонстрации и не могут использоваться для получения результатов во время анализа.

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

7 ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные и ненормальные значения.

7.1 Здоровые взрослые люди

В исследовании, проведенном на нормальных здоровых взрослых людях, используя набор DRG Эстриол свободный ИФА, были получены следующие данные.

Население	Число испытуемых	5% процентиль	95% процентиль
мужчины	42	0,146 нг/мл	0,573 нг/мл
женщины (не беременные)	43	0,057 нг/мл	0,822 нг/мл

Результаты анализа не могут быть единственной причиной терапевтического заключения. Результат должен коррелировать с другими клиническими исследованиями и диагностическими тестами.

7.2 Значения во время беременности

Неделя беременности	Ожидаемый диапазон (нг/мл)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Неделя беременности	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	Беременность близнецами (нг/мл)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

8 КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Измерение свободного эстриола в биологических жидкостях человека используется для мониторинга и контроля над состоянием плода, особенно у женщин, входящих в группу риска. Концентрация свободного эстриола в плазме постепенно повышается до 20 недели и быстрее на третьем триместре. Так как диапазон нормального и ненормального уровня содержания эстриола широк, однократное определение будет мало полезно. Пациент должен наблюдаться часто для определения индивидуальной склонности.

Постоянное низкое содержание или резкое падение уровня свободного эстриола на третьем триместре показывает патологическое состояние плода или возможную смерть. При получении таких результатов необходимо использование альтернативных методов оценки состояния плода.

Интерпретация результатов должна производиться в сочетании с другими клиническими тестами и диагностическими процедурами, такими как амниоцентез и ультразвук. Отклоняющиеся от нормы уровни содержания ЕЗ могут встречаться у пациентов, принимающих некоторые антибиотики или кортикостероиды или у пациентов с ослабленной функцией печени.

9 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Лабораторная практика требует, чтобы контроль должен быть проанализирован с каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализированы, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории.

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли с нормальными и патологическими уровнями.

Контроли и соответствующие им результаты, полученные Лабораторией Контроля Качества, указаны в Паспорте Качества, приложенном к набору. Значения и диапазоны, указанные на листе КК, всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы промывки.

После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

10 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**10.1 Динамический диапазон анализа**

Динамический диапазон анализа составляет 0,075 – 40 нг/мл

10.2 Специфичность (Кросс-реакция)

Следующие вещества были протестированы для выявления кросс-реакции:

Стероид	Концентрация (нг/мл)	ОП 450	Определенная концентрация
Эстриол	40	0,39	39,67 нг/мл
Тестостерон	16	1,758	Не определяема
Эстрадиол	2	1,579	Не определяема
Эстрон	2	1,712	Не определяема
Кортизол	800	1,775	Не определяема

10.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность ИФА ДРГ была определена вычитанием двух стандартных отклонений от значений 20 анализов Нулевого Стандарта в дубли и составила **0,075 нг/мл**.

10.4 Коэффициент вариации (КВ)**10.4.1 Интра-анализ**

Вариабельность внутри одной постановки:

Образец	Кол-во	Значение (нг/мл)	КВ (%)
1	20	2,1	4,7
2	20	6,2	3,2
3	20	14,6	3,0

10.4.2 Интер-Анализ

Вариабельность между постановками:

Образец	Кол-во	Значение (нг/мл)	КВ (%)
1	12	2,1	4,6
2	12	5,7	8,5
3	12	13,3	9,5

10.5 Восстановление

Восстановление ИФА ДРГ было определено добавлением возрастающих количеств аналита в три различные сыворотки содержащих различное количество эндогенного аналита. Каждый образец был проанализирован и концентрации аналита были определены по стандартной кривой. Процент восстановления был определен путем сравнение ожидаемых и определенных концентраций.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [нг/мл]	1,3	3,6	7,8
Медиана открытия	100,8	101,8	106,9
Диапазон открытия [%]	от	89,0	92,3
	до	103,8	109,8
		112,3	

10.6 Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [нг/мл]	2,6	7,2	15,6
Медиана открытия	98,2	99,7	100,2
Диапазон открытия [%]	от	86,3	90,4
	до	107,9	106,8
		103,7	

11 ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены, если процедура осуществляется с полным пониманием приложенной инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация данного теста могут повлиять на результаты.

11.1 Интреферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,125 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты исследования.

11.2 Влияние медикаментов

На сегодняшний день неизвестны медикаменты, которые имеют влияние на измерение Эстриола свободного в образце.

11.3 Хук-Эффект

В этом анализе хук-эффект не обнаружен.

12 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

12.1 Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с DRG.

12.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение.

Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

12.3 Ответственность

Любое изменение набора и / или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно.

Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны.

Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.

13 ЛИТЕРАТУРА

Bashore, R.A., Westlake, J.R. Plasma unconjugated estriol values in high risk pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., June 15, 1977, p371-380