

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ЭСТРИОЛА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

EIA-3717, Estriol Total ELISA

Каталог. № : EIA-3717
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 10-2012
Версия 6.0



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Конкурентный иммуноферментный колориметрический метод для количественного определения концентрации Общего Эстриола в сыворотке или плазме человека. Только для лабораторного использования.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Эстриол общий (антиген) образца соревнуется с меченым пероксидазой хрена эстриолом (антигеном с ферментной меткой) за место связи с ограниченным количеством участков антител к эстриолу на микротитровальных лунках (твердая фаза). После инкубации несвязанный эстриол удаляется в ходе промывки. Затем добавляются субстрат фермента (H₂O₂) и хромоген (ТМБ). По истечении необходимого для проявления окрашивания времени ферментативная реакция прекращается добавлением стоп-раствора. Концентрация эстриола в образце рассчитывается по стандартам. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации общего эстриола в образце.

3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТ

3.1 Поставляемые в наборе

1. **Стандарты** Общего Эстриола (4 флакона, 1 мл каждый)
2. **Контроль** Общего Эстриола (1 флакон, 1 мл)
3. **Инкубационный буфер** (1 флакон, 30 мл): фосфатный буфер 50 мл, pH 7.5; BSA 1 г/л
4. **Ферментный конъюгат** (1 флакон, 1 мл): HRP-конъюгат эстриола
5. **Микропланшет**: антитела класса IgG, к эстриолу, нанесенные на микропланшет
6. **Субстратный раствор** (1 флакон, 15 мл): H₂O₂ - ТМБ 0.26г/л (избегать попадания на кожу)
7. **Стоп-раствор** (1 флакон, 15 мл): серная кислота 0.15 моль/л (избегать попадания на кожу)

3.2 Реагенты, не поставляемые в наборе

Дистиллированная вода

3.3 Дополнительные материалы и инструмент

Автоматический диспенсер (пипетка)

Микропланшетный ридер

Примечание

Хранить все реагенты при температуре от 2 °С до - 8 °С в темноте. Вскрывать упаковку микропланшета только после доведения до комнатной температуры и закрыть немедленно после использования. Не удалять клейевые полоски на не использованных стрипах.

4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты при работе с реагентами.
- Некоторые реагенты содержат небольшие количества Проклин 300® в качестве консервантов. Избегать попадания на кожу или слизистую оболочку.
- Субстрат ТМБ содержит раздражитель, который может причинить вред при вдыхании, заглывании или впитывании через кожу. Во избежание травм, избегайте вдыхания, проглатывания или контакта с кожей и глазами.

- Стоп-раствор состоит из разбавленного раствора серной кислоты. Серная кислота является ядовитой и коррозионной и может быть токсичной при проглатывании. Чтобы избежать химических ожогов, избегайте контакта с кожей и глазами.
- Избегайте влияния прямого солнечного света, контакта с металлами и оксидантами реагента ТМБ/H₂O₂.
- Этот метод позволяет определить Общий Эстриол от 2 нг/мл до 200 нг/мл.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Пожалуйста, строго придерживайтесь последовательности шагов пипетирования, описанных в этом протоколе.
- Все реагенты следует хранить в холодильнике при температуре 2 °С - 8 °С в оригинальной упаковке. Все исключения четко указаны на этикетке.
- Привести все компоненты набора и образцы к комнатной температуре (22-28 °С) и хорошо перемешать перед использованием.
- Не перепутайте компоненты набора из разных партий. Сроки годности, указанные на этикетках коробки и флаконах, должны быть соблюдены. Не используйте комплект компонентов после истечения срока годности.
- При использовании автоматизированного оборудования убедитесь, что комплект был надлежащим образом проверен.
- Неполное или неточное удаление жидкости из лунок может влиять на точность анализа и/или увеличить значения.
- Важно, чтобы время реакции для каждой лунки было стабильным для воспроизводимых результатов. Пипетирование проб не должно занимать более десяти минут, чтобы избежать смещения результатов теста. Если необходимо более 10 минут, следуйте установленному порядку проведения анализа. Если используется более одного планшета, рекомендуется повторять построение кривой в каждой пластине.
- Добавление раствора ТМБ субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп-раствора. Поэтому субстрат ТМБ и стоп-раствор должны быть добавлены в той же последовательности, чтобы устранить любые отклонения времени в ходе реакции.
- Соблюдать руководящие принципы для обеспечения контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или пул сывороток.
- Требуется максимальная точность при приготовлении и внесении реагентов.
- Образцы, биологически загрязненные, не должны использоваться в анализе. Высоко липемические или гемолизированные образцы также не должны использоваться.
- Измерения проводить вертикально. Не касаться нижней части лунки.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Приготовление стандарта (S1, S2, S3, S4)

Перед использованием перемешать в течение 2 минут.

Стандарты имеют следующие концентрации эстриола:

	S1	S2	S3	S4
нг / мл	2,0	20,0	80,0	200,0

Стабилен до истечения срока годности набора при 2 - 8 °С.

После вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при 2 - 8 °С.

6.2 Подготовка разведенного конъюгата

Подготовка непосредственно перед использованием.

Добавить 10 мкл конъюгата (реагент 4) к 2,0 мл буфера для инкубации (реагент 3).

Осторожно смешивать в течение 5 минут.

Стабильный в течение 3 часов при комнатной температуре (22 - 28 °С).

6.3 Подготовка образца

Определение общего эстриола должно выполняться в сыворотке или плазме человека.

Хранить образцы при -20 °С, если определение не выполняется в тот же день сбора проб. Избегать повторного замораживания/оттаивания образцов. Контроль готов к использованию.

6.4 Процедура

Поскольку необходимо выполнить определение в двух экземплярах, подготовить по две лунки для ВО, две для каждой точки кривой (S1-S4), две для каждого Контроля, для каждого образца, и одну для Бланка.

Реагент	В ₀	Стандарт	Образец/ Контроль	Бланк
Инкубационный Буфер	20 мкл			
Образец/Контроль			20 мкл	
Стандарты S1-S4		20 мкл		
Разведенный конъюгат	200 мкл	200 мкл	200 мкл	
Инкубировать при 37 °С в течение 1 часа. Удалить содержимое каждой лунки; промыть лунки 2 раза с 300 мкл дистиллированной воды.				
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать при 22-28 °С в темноте.				
Стоп раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Аккуратно потрясти микропланшет. считать Плотность (E) при 450 по отношению к Бланку.				

7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна проверять контроли при нормальных, высоких и низких уровнях диапазона Общего Эстриола для контроля качества анализа. Эти элементы контроля должны рассматриваться как неизвестные и определять значения необходимо в каждой процедуре теста. Графики контроля качества должны быть сохранены для характеристик поставляемых реагентов. Соответствующие статистические методы следует использовать для выяснения тенденций. Каждая лаборатория должна установить границы анализа. Другие параметры, которые должны быть проверены, включают 80, 50 и 20% пересечения стандартной кривой. Кроме того, максимальное поглощение должно согласовываться с прошлым опытом. Значительное отклонение от показателей указывает на незамеченное изменение в условиях или деградацию реагентов в наборе. Свежие реагенты должны быть использованы, чтобы определить причину отклонений.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1 Средние значения абсорбции

Рассчитать среднее значение абсорбции (Em) для каждой точки стандартной кривой (S1-S2) и каждого образца.

8.2 Стандартная кривая

Отложить значения плотностей стандартов против их концентраций. Проведите оптимальную кривую через точки на графике (например: четырех-параметровую логистическую кривую).

8.3 Подсчет результатов

Интерполировать значения образцов на стандартную кривую для получения соответствующих значений концентрации, выраженной в нг/мл.

9. КОНТРОЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрации Эстриола в сыворотках приведены ниже:

Недели	Медиана	Диапазон (нг/мл)
17°	18.0	(10-27)
18°	25.9	(14-51)
19°	39.5	(26-52)
20°	40.0	(27-53)
21°	45.6	(24-66)
22°	39.2	(25-58)
23°	56.1	(27-70)
24°	56.3	(28-75)
25°	64.3	(29-84)
26°	68	(41-105)
27°	57.4	(41-110)
28°	78.0	(38-127)
29°	87	(45-146)
30°	75	(45-160)
31°	88.0	(50-170)
32°	90.5	(46-175)
33°	100	(60-180)
34°	105.6	(60-190)
35°	114.2	(65-200)
36°	126.0	(74-210)
37°	177.0	(90-234)
38°	190.0	(101-288)
39°	190.0	(102-306)
40°	180.0	(60-325)
41°	177.5	(95-280)

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Точность

10.1.1 Вариация в анализе

Вариация в анализе определялась измерением повторов (x16) двух различных контрольных сывороток в одном анализе и составила $\leq 9.7\%$.

10.1.2 Вариация между анализами

Вариация между анализами определялась измерением повторов (x12) трех различных контрольных сывороток из различных наборов и составила $\leq 10\%$.

10.2 Достоверность

Восстановление Общего Эстриола со значениями 10-40-100 нг/мл, добавленного к двум образцам, дало средний результат ($\pm SD$) 94.88 % $\pm 4.47\%$ по отношению к исходным концентрациям.

10.3 Чувствительность

Наименьшая обнаруживаемая концентрация Общего Эстриола составила 0.22 нг/мл с доверительным пределом 95 %.

10.4 Специфичность

Перекрестная реактивность антител, подсчитанная при 50 %, приведена ниже:

Эстриол	100 %
16 эпи-Эстриол	10.5 %
15 α ОН-Эстриол	7.0 %
Эстриол 3 Сульфат	2.0 %
Эстрадиол	0.1 %
17 эпи-Эстриол	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Эстриол 3 α Глюкоронат	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Эстриол 16 α Глюкоронат	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Эстрон	$< 1 \times 10^{-4} \%$

10.5 КОРРЕЛЯЦИЯ С RIA

Общий Эстриол ИФА сравнивался с другим коммерчески доступным набором Общего Эстриола. Было проанализировано 32 образца сыворотки. Была рассчитана кривая Линейной регрессии.

$$y = 0,86x + 3,85$$

$$r^2 = 0,952$$

$$y = \text{Общий Эстриол ELISA (EIA-3717)}$$

$$x = \text{Общий Эстриол Набор Adaltis RIA}$$

11. ОБРАЩЕНИЕ С ОТХОДАМИ

Реагенты должны быть утилизированы в соответствии с местными правилами.

13. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Возможные причины ошибок/Рекомендации по их устранению

Нет колориметрической реакции

- Отсутствие реакции после добавления конъюгата
- Загрязнение конъюгатов и/или субстрата
- Ошибки в проведении процедуры (например, ошибочное пипетирование реагентов в неверном порядке или не из того флакона, и т.п.)

Слишком слабая реакция (очень низкие OD)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Слишком короткое время инкубации, температура инкубации слишком низкая

Слишком сильная реакция (очень высокие OD)

- Неверный конъюгат (например, не из оригинального набора)
- Слишком длительное время инкубации, температура инкубации слишком высокая
- Низкое качество воды для промывочного буфера (низкий уровень деионизации)
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Непонятные результаты

- Загрязнение пипеток, наконечников или ёмкостей
- Недостаточная промывка (конъюгаты полностью не удалены)

Слишком высокое значение CV % внутри анализа

- Реагенты и/или полоски не приведены к комнатной температуре перед использованием
- Промывочное устройство не работает надлежащим образом (совет: почистить головку для промывки)

Слишком высокое значение CV % между анализами

- Условия инкубации не постоянны (время, температура)
- Контроли и образцы не добавлялись с одинаковым промежутком времени (с одинаковыми интервалами) (проверить порядок пипетирования)
- Человеческий фактор



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