

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЕСТРАДІОЛУ МЕТОДОМ ІФА

Estradiol (E2) Test System

Кат. №: 4925-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 5



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

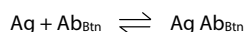
Призначення: Кількісне визначення концентрації естрадіолу в сироватці крові або плазмі за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз з затримкою (ТИП 9):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають антитіла, кон'югат фермент-антиген і природний антиген. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить нативний антиген, проходить реакція між антигеном і антитілом. Взаємодія ілюструється рівнянням:

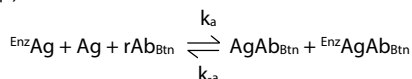


Ab_{Btn} = Біотинильовані антитіла

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

$AgAb_{Btn}$ = Комплекс антиген-антитіло

Після короткої інкубації вноситься ферментний кон'югат. (Ця затримка з внесенням дозволяє підвищити чутливість для зразків з низькою концентрацією зразків). При додаванні ферментного кон'югату відбувається конкурентна реакція між ферментним аналогом і антигеном зразка за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл (не зайнятих при першій інкубації)

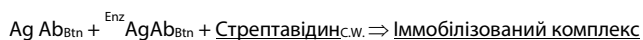


${}^{Enz}Ag$ = кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

${}^{Enz}AgAb_{Btn}$ = комплекс кон'югат фермент-антиген і антитіла

rAb_{Btn} = біотинильовані антитіла, що не прореагували в 1 інкубації

Одночасно в лунках утворюється комплекс при реакції біотину, прикріпленого до антитіл і стрептавідину, мобілізованих в лунках. Це призводить до поділу пов'язаних антитіл після декантування або аспірації.



$\text{Стрептавідин}_{C.W.}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Естрадіолу - 1 мл (мл)/флакон

Сім флаконів референсної сироватки для Естрадіолу з концентраціями 0 (A), 20 (B), 100 (C), 250 (D), 500 (E), 1500 (F) та 3000 (G) пг/мл (pg/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містить консерванти. Концентрації стандартів можуть бути виражені в молях (пмоль/л (pmol/l)) множенням на коефіцієнт 3.67.

Наприклад: 1 пг/мл (pg/ml) x 3.67 = 3.67 пмоль/л (pmol/l)

B. Ферментний реагент Естрадіолу - 6.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить кон'югат Естрадіолу (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині, з червоним барвником. Зберігати при 2-8 °C (°C).

C. Біотиновий реагент Естрадіолу - 6.0 мл (мл)

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до Естрадіолу, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, зелений барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл (µg/ml) Стрептавідину і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору та компонентів зазначені на етикетці.

Зауваження 3: Перераховані реагенти для одного 96-луноквого мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 та 50 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 100 и 350 мкл (µl) с точністю не гірше 1.5%
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно)
4. Фільтрувальний папір для просушування планшета
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm)
6. Поліетиленова плівка чи кришка для інкубації мікропланшета
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання
8. Таймер
9. Контрольні матеріали

5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, NHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи гепаринової плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівнюваності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натщесерце. Зберіть кров в пробірці для венепункції з червоною кришечкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірку з ЕДТА або гепарином для плазми. Дозвольте крові згорнутись (для сироватки). Відцентрифугуйте зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть бути охолоджені до 2-8 °C (°C) на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.050 мл (мл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролі відповідно з низьким, нормальним і високим діапазоном для відстеження характеристик набору. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик поставлених реагентів. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або деградацію реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТУ

1. Промивний розчин

Розведіть вміст концентрату промивного буферу до 1000 мл (ml) дистильованою чи деіонізованою водою в придатній посудині. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °C (°C) до 60 днів.

Примітка: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають ознаки росту бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти та контролі повинні досягнути кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедура тестування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом****

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть смужки, які не використовуються, в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (μl)) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Ферментного кон'югату Естрадіолу в кожну лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
5. Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
6. Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Ферментного Реагенту Естрадіолу в кожну лунку.
Додавати прямо на реагенти, які знаходяться в лунках.
7. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
8. Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 90 хвилин при кімнатній температурі.
9. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
10. Додайте 350 мкл (μl) буфера для промивок (див. розділ «Підготовка реагенту») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть промивний розчин і повторіть ще 2 рази.
11. Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Підготовка реагенту»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

12. Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
13. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте лунки протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
14. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 3000 пг/мл (pg/ml) необхідно розвести в 5 або 10 разів «0» калібратором Естрадіолу або чоловічою пулованою сироваткою з відомо низькою концентрацією Естрадіолу.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Естрадіолу в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації Естрадіолу в пг/мл (pg/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).

3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
4. Визначте невідомі концентрації Естрадіолу у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.202 перетинає стандартну криву при 160 пг/мл (pg/ml) (див. мал.1)

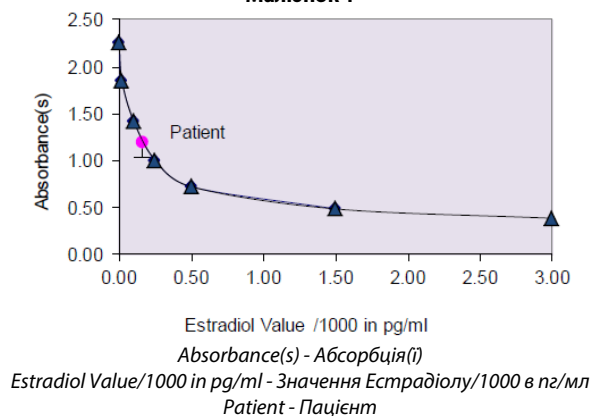
Примітка: Програмне забезпечення для аналізу даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для аналізу даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити програмне забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (пг/мл (pg/ml))
Калібратор А	A1	2.268	2.256	0
	B1	2.244		
Калібратор В	C1	1.839	1.849	20
	D1	1.860		
Калібратор С	E1	1.409	1.426	100
	F1	1.443		
Калібратор D	G1	1.017	1.003	250
	H1	0.989		
Калібратор E	A2	0.698	0.723	500
	B2	0.748		
Калібратор F	C2	0.480	0.487	1500
	D2	0.493		
Калібратор G	E1	0.390	0.388	3000
	F2	0.385		
Пацієнт 1	G3	1.202	1.202	160
	H3	1.203		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

1. Оптична густина Калібратора 0 пг/мл (pg/ml) повинна бути ≥ 1.8 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні впадати в установлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризиків для цього продукту доступні на запит від Monobind Inc.

12.1 Якість набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.

- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних досліджень», Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.**
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції, очікувані значення при використанні даного методу наведені в таблиці 1:

	Медіана	Діапазон
Чоловіки	19	4-94
Жінки		
Фолікулярна фаза	48	9-175
Середина циклу	103	44-196
Лютеїнова фаза	209	107-281
Постменопауза при лікуванні	122	42-289
Постменопауза без лікування	7.3	н/д-20
Оральні контрацептиви	13	н/д-103

При вагітності рівні сироваткового естрадіолу швидко піднімаються аж до кінця третього триместру.

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції «нормальних» людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, тестованої популяції і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору для визначення Естрадіолу всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Число, значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (пг/мл (pg/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	81.9	8.1	9.9
Нормальний	20	242.7	20.5	8.5
Високий	20	423.7	7.5	7.5

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами (пг/мл (pg/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	106.1	5.1	4.8
Нормальний	20	261.5	10.0	3.8
Високий	20	436.7	13.5	8.2

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 8.2 пг/мл (pg/ml) для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (пг/мл (pg/ml)) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним хемілюмінесцентним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом Естрадіолу (діапазон значень 10-4300 пг/мл (pg/ml)). Загальна кількість зразків - 65. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія (тТ4)

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	336.8	$y = 36.50 + 1.023(x)$	0.989
Референсний	293.4		

Було знайдено лише незначне розходження даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують чудову узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин у різних концентраціях до сироваткової матриці. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність
Андростенедіон	0.0003
Дигідротестостерон	0.0008
Кортизол	< 0.0001
Кортикостерон	< 0.0001
Кортизол	0.0004
Естріол	< 0.0001
ДГЕА Сульфат	< 0.0001
Естрадіол	< 0.0001
Естрон	< 0.0001
Тестостерон	< 0.0001

