НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСТРАДИОЛА (E2)

4925-300, Estradiol (E2) Test System

Каталог. № : ***4925-300*** *Методика от* ***03-09-2012***
Количество : ***96*** *Версия* ***4***
Производитель: ***Monobind (США)***

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

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Эстрадиола (E2) в человеческой сыворотке или плазме.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Измерение эстрадиола в сыворотке и плазме считается наиболее достоверным отображением его продукции.

Эстрадиол (17бета-эстрадиол) – стероидный гормон (мол. вес 272,3 Да), циркулирующий преимущественно связанным с белком.. Кроме эстрадиола, натуральными стероидными эстрогенами являются эстрон, эстриол и их метаболиты. Натуральные эстрогены – гормоны, секретирующиеся, в основном, фолликулами яичников, а также надпочечниками, желтым телом, плацентой, и, у мужчин, яичками. Экзогенные эстрогены, натуральные или синтетические, выявляют все фармакологические эффекты эндогенных эстрогенов в разной степени.

Эстрогенные гормоны секретируются в разных количествах на протяжении менструального цикла на протяжении всей активности яичников. При беременности плацента становиться основным источником эстрогенов. При менопаузе секреция эстрогенов яичниками уменьшается с разной скоростью. Гоадотропины передней доли гипофиза регулирует секрецию овариальных гормонов прогестерона и эстрдиолагипоталамический контроль продукции гипофизарного гонадотропина регулируется обратной связью концентрацией эстрогена и прогестероа в плазме. Эта система с обратной связью приводит к циклическим явлениям овуляции и менструации. Определение эстрадиола используется в разных контекстах, включая раннее половое созревание в девочек и гинекомастии у мужчин. Он используется для диагностики при аменорее и при мониторинге индукции овуляции.

В этом наборе используются специфические антитела к эстрадиолу и не требуется предварительной экстракции образцов сыворотки или плазмы. Перекрестная реактивность к другим натуральным и структурно похожим стероидам низкая. Использование нескольких стандартов сыворотки с известной концентрацией эстрадиола позволяет построить калибровочную кривую. По сравнению с дозозависимой кривой определяется активность неизвестных образцов, коррелирующая с концентрацией эстрадиола.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммуноферментный анализа (тип 9)

Настоящие реагенты, необходимые для иммуноферментного определения, включают антитела, кон'югат фермент-антиген и естественный антиген. При смешивании биотинилированных антител, и сыворотки, содержащей нативный антиген, проходит реакция между антигеном и антителом. Взаимодействие иллюстрируется уравнением

$$Ag + Ab_{Btn} \rightleftharpoons Ag\,Ab_{Btn}$$

Ab_{Btn} = биотинилированные антитела
Ag = нативный антиген (переменное количество)
$Ag\,Ab_{Btn}$ = комплекс антиген-антитело

После краткой инкубации вносится ферментный конъюгат. (Эта задержка с внесением позволяет повысить чувствительность для образцов с низкой концентрацией образцов). При добавлении ферментного конъюгата происходит конкурентная реакция между ферментным аналогом и антигеном образца за ограниченное количество сайтов связывания антител (не занятых при первой инкубации)

$$^{Enz}Ag + Ag + rAb_{Btn} \rightleftharpoons AgAb_{Btn} + {}^{Enz}AgAb_{Btn}$$

^{Enz}Ag = конъюгат фермент –антиген (постоянное количество)
$^{Enz}AgAb_{Btn}$ = комплекс конъюгат фермент –антиген и антитела
rAb_{Btn} = биотинилированные антитела, не прореагировавшие в 1 инкубации

Одновременно в ячейках образуется комплекс при реакции биотина, прикрепленного к антителам и стрептавидина, иммобилизированного в лунках. Это приводит к разделению связанных антител после декантации или аспирации.

$Ag\,Ab_{Btn} + {}^{Enz}Ag\,Ab_{Btn}$ + стрептавидин$_{C.W.}$ $\Rightarrow$ имм. комплекс
стрептавидин$_{C.W.}$ = стрептавидин, иммобилизованный на ячейках

Активность фермента во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

A. Калибраторы Эстрадиола - 1 мл/флакон - значки A-G
67 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями ЭСТРАДИОЛА 0 (**A**), 20 (**B**), 100 (**C**), 250 (**D**), 500 (**E**), 1500 (**F**) и 3000 (**G**) пг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.
Калибраторы могут выражаться в молярных концентрациях (пмоль/л) умножением на 3.67. Например: 1 пг/мл x 3.67 = 3.67 пмоль/л

B. Ферментный Реагент Эстрадиола – 6.0 мл/флакон - значок Ⓔ
Один флакон, содержащий конъюгат Эстрадиол (аналог)-пероксидаза хрена (HRP) в белковом буфере, красный краситель. Хранить при 2-8°C.

C. Эстрадиол биотиновый реагент - 6 мл/флакон.
Один флакон, содержащий Анти-Эстрадиоловые биотинилированные очищенные кроличьи IgG в буфере, зеленый краситель и консервант. Хранить при 2-8°C

D. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок ⇓
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запакованный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.

E. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.

F. Реагент Субстрата - 12 мл/флакон - значок S^N
Один флакон, содержащий ТМБ и H_2O_2 в буфере. Хранить при 2-8°C.

G. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок STOP
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.

H. Инструкция к набору.

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8 °C.
Замечание 3*:* Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозатор на 25, 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Пипетки на 200-1000 мкл для конъюгата
4. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутыль
5. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
6. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
7. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
8. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
9. Таймер
10. Контрольные материалы

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики *in vitro*
Не для внутреннего или наружного использования на людях или животных

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита B. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или,

например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служат кровь, сыворотка и гепаринизированная плазма. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.020 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

1. **Буфер для промывок**
   Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
2. Добавьте по 0.025 мл (25 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте пипеткой по 0.050 мл (50 мкл) биотинового конъюгата Эстрадиола в каждую лунку.
4. Осторожно перемешайте планшет в течение 20-30 секунд.
5. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
6. Добавьте пипеткой по 0.050 мл (50 мкл) ферментного конъюгата Эстрадиола в каждую лунку.

Вносите все реагенты близко ко дну ячеек.

7. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
8. Инкубируйте 90 минут при комнатной температуре.
9. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
10. Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел “Приготовление реагентов”) и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
11. Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. “Приготовление реагентов”). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

12. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
13. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
14. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

Замечание. Разбавьте образцы с ожидаемой концентрацией выше 3000 пг/мл 1:5 или 1:10 калибратором эстрадиола "0" пг/мл или мужской сывороткой с известно низким уровнем эстрадиола.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации Эстрадиола в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации Эстрадиола в пг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите концентрации Эстрадиола в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция (1.202) пересекает стандартную кривую при 160 пг/мл (см. рис.1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация пг/мл
Калибратор A	A1	2.268	2.256	0
	B1	2.244		
Калибратор B	C1	1.839	1.849	20
	D1	1.860		
Калибратор C	E1	1.409	1.426	100
	F1	1.443		
Калибратор D	G1	1.017	1.003	250
	H1	0.989		
Калибратор E	A2	0.698	0.723	500
	B2	0.748		
Калибратор F	C2	0.480	0.487	1500
	D2	0.493		
Калибратор G	E2	0.390	0.388	3000
	F2	0.385		
Образец	G2	1.202	1.202	**160**
	H2	1.203		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и **не должны** использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1

(См. оригинал инструкции).

11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Калибратора 0 пг/мл должна быть ≥ 1.3
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
4. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
5. Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
6. Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
7. Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
8. Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
9. Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
10. Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.

11. Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
12. Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных *Monobind Inc.,* может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

1. ***Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.***
2. Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализов.
3. Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
4. Производитель не несет ответственности за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
5. Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Было проведено исследование "нормальной" взрослой популяции и женщин во время гестации для получения результатов на этом наборе. Результаты исследования показаны в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1
Ожидаемые значения для ЭСТРАДИОЛА

	Медиана	Диапазон
Женщины		
Фолликулярная фаза	48	9-175
Середина цикла	103	44-196
Лютеиновая фаза	209	107-281
Постменопауза при лечении	122	42-289
Постменопауза без лечения	7.3	н/д-20
Оральные контрацептивы	13	н/д-103
Мужчины	19	4-94

При беременности уровни сывороточного эстрадиола быстро поднимаются вплоть до конца третьего триместра.

Важно иметь ввиду, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции “нормальных” людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (пг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	20	81.9	8.1	9.9
Уровень 2	20	242.7	20.5	8.5
Уровень 3	20	423.7	7.5	7.5

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (пг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	20	106.1	5.1	4.8
Уровень 2	20	261.5	10.0	3.8
Уровень 3	20	436.7	13.5	8.2

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях в течение 10 дней.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 8.2 пг/мл. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (пг/мл) плюс 2σ (σ-стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным хемилюминесцентным методом. Использовались образцы сывороток с низкой, средней и высокой концентрацией (от 10 пг/мл до 4300 пг/мл). Общее количество образцов составило 65. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	336.8	Y= 36.50 + 1.023 (x)	0.989
Метод сравнения	293.4		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Перекрестная реактивность данного метода определения Эстрадиола с выбранными веществами изучали добавлением влияющих веществ к сыворотке в различных концентрациях. Перекрестная реактивность оценивалась расчетом отношения дозы влияющего вещества к дозе, необходимой для получения той же абсорбции.

Вещество	Перекрестная реактивность
Андростенедион	0.0003
Дигидротестостерон	0.0008
Кортизон	< 0.0001
Кортикостерон	< 0.0001
Кортизол	0.0004
Эстриол	< 0.0001
ДГЕА сульфат	< 0.0001
Эстрадиол	< 0.0001
Эстрон	< 0.0001
Тестостерон	< 0.0001

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»