

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОНЪЮГИРОВАННОГО ЭСТРИОЛА (u-E3)

## 5025-300, Unconjugated Estriol (u-E3) Test System

Каталог. № : 5025-300  
Количество : 96  
Производитель: Monobind (США)

Методика от 03-09-2012  
Версия 3



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 Неконъюгированного (Свободного) Эстриола в человеческой сыворотке или плазме.

### 2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

В последние несколько лет наблюдается развитие скрининговых программ для выявления синдрома Дауна у плода с помощью определения различных маркеров в крови матери. Хотя амниоцентез достаточно широко распространен в последние 40 лет, для пренатальной диагностики его можно использовать только выборочно, из-за большой опасности для плода. Чаще всего для дифференциальной диагностики применяют определение U-ЭСТРИОЛА, hCG, свободной бета-субъединицы HCG и свободного эстриола<sup>12</sup>.

В кровотоке беременной женщины присутствует практически только свободный эстриол фетального происхождения, синтезирующийся из предшественников, проникающих через плаценту<sup>3</sup>. Клинические исследования показали, что при неосложненной беременности продукция эстриола монотонно возрастает и достигает максимума в последнем триместре; однако, при беременности, осложненной плацентарной недостаточностью, синтез эстриола быстро снижается. Много лет наиболее широко используемым методом мониторинга синтеза эстриола (как показателя фетального стресса) было определение эстриола и конъюгатов эстриола в образцах суточной мочи. Однако изменения в почечном клиренсе и суточные колебания делают результаты таких определений сомнительными. В последние годы, в качестве альтернативного метода определения в моче, исследователями был предложен метод определения свободного эстриола в плазме беременных женщин, как лучший маркер фетального стресса<sup>16</sup>. Патологически низкий уровень эстриола у беременных женщин может указывать на проблемы развития у ребенка. Уровень эстриола у небеременных женщин сильно не изменяется после наступления менопаузы, и нет значительных отличий от уровня у мужчин<sup>7</sup>.

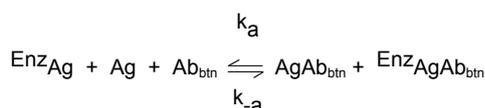
В данном методе использованы специфические антитела к эстриолу, и не требуется предварительной подготовки, экстракции образцов сыворотки или плазмы. Перекрестная реактивность с другими существующими стероидами со схожей структурой низкая. Использование различных сывороточных стандартов и известными количествами эстриола позволяет построить график зависимости активности от концентрации. Сравнивая активность образца с калибровочной кривой, можно рассчитать концентрацию эстриола в образце.

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Конкурентный иммуноанализ (тип 7).

Настоящие реагенты, требующиеся для твердофазного иммуоферментного анализа, включают антитела, конъюгат фермента с антигеном и нативный антиген. При смешивании биотинилированных антител, конъюгата фермент-антиген и нативного антигена, содержащегося в сыворотке, происходит конкуренция между нативным антигеном образца и конъюгатом фермент-антиген за ограниченное число иммобилизованных сайтов связывания.

Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



$\text{Ab}_{\text{btн}}$  = биотинилированные антитела (постоянное количество)

$\text{Ag}$  = нативный антиген (переменное количество)

$\text{EnzAg}$  = конъюгат фермент-антиген (постоянное количество)

$\text{AgAb}_{\text{btн}}$  = комплекс антиген-антитело

$\text{EnzAgAb}_{\text{btн}}$  = комплекс конъюгат - антитела

$k_a$  = константа скорости ассоциации

$k_{-a}$  = константа скорости диссоциации

$K = k_a / k_{-a}$  = константа равновесия

Происходит реакция между биотином, связанным с антителами и стрептавидином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Это позволяет отделить фракцию, связавшуюся с антителами, при декантировании или аспирации.

$\text{AgAb}_{\text{btн}} + \text{EnzAgAb}_{\text{btн}} + \text{стрептавидин}_{\text{cw}} \Rightarrow$  иммобилизованный комплекс

стрептавидин<sub>cw</sub> = стрептавидин, иммобилизованный в лунках

Иммобилизованный комплекс = «сэндвич» комплекс, связанный с твердой фазой (поверхностью лунок)

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 в образцах.

### 4.0 РЕАГЕНТЫ

**Поставляемые материалы:**

- A. Калибраторы u-Эстриола - 1 мл/флакон - значки A-F**  
6 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями u-Эстриола 0 (A), 0.4 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 15 (E) и 30.0 (F) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты. Концентрации стандартов могут быть выражены в молях (нмоль/л) умножением на коэффициент 3.45. Например: 1 нг/мл x 3.45 = 3.45 нмоль/л
- B. Ферментный Реагент u-Эстриола – 6.0 мл/флакон - значок E**  
Один флакон, содержащий конъюгат Эстриола (аналог) с пероксидазой хрена (HRP) в белковом стабилизирующем растворе, с красным красителем. Хранить при 2-8°C.
- C. Биотинилированный u-E3 Реагент - 6.0 мл/флакон, значок V**  
Один флакон, содержащий биотинилированные антитела к u-E3, очищенные конъюгированные кроличьи IgG в буфере, голубой краситель, консервант. Хранить при 2-8°C.
- D. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок J**  
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запаянный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- E. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок D**  
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.
- F. Субстрат A - 7 мл/флакон - значок S<sup>A</sup>**  
Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.
- G. Субстрат B - 7 мл/флакон - значок S<sup>B</sup>**  
Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- H. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок STOP**  
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.
- I. 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. Диспенсеры переменного объема (200–1000 мкл) для конъюгата
4. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
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

## 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 В. 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, NHS Publication No. (CDC) 88-8395.

## 6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служат кровь, сыворотка. 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 0.050 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.

### 2. Рабочий субстратный раствор – стабилен 1 год

Смешайте Субстраты, вылив содержимое коричневого флакона с Субстратом А во флакон Субстрат В. Закройте смесь желтой крышкой для легкой идентификации. Перемешайте смесь и подпишите флакон «Рабочий раствор субстрата». Раствор хранится при 2-8 °C.

**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).

- 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.**
- Добавьте по 0.025 мл (25 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
- Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
- Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
- Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) конъюгата биотин-и-Е3 в каждую лунку.
- Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
- Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
- 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).

- 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

- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- 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.**
- 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:** Образцы с концентрацией выше 30 нг/мл необходимо развести, в 2 и/или в 5 раз, стандартом «0» или мужской сывороткой с известной низкой концентрацией эстриола. Полученный результат следует умножить на коэффициент разведения 2 или 5, для получения концентрации в исходном образце.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации и-Эстриола в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

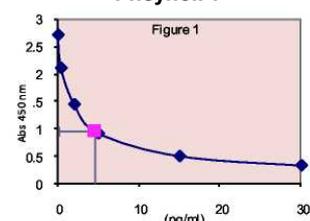
- Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
- Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации и-Эстриола в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
- Проведите оптимальную калибровочную кривую.
- Определите концентрации и-Эстриола в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция (0.967) пересекает стандартную кривую при 4.71 нг/мл (см. рис.1)

### ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	2.742	2.732	0
	B1	2.722		
Калибратор В	C1	2.155	2.123	0.4
	D1	2.091		
Калибратор С	E1	1.492	1.456	2.0
	F1	1.420		
Калибратор D	G1	0.940	0.921	5.0
	H1	0.903		
Калибратор E	A2	0.523	0.508	15.0
	B2	0.493		
Калибратор F	C2	0.342	0.336	30.0
	D2	0.330		
Контроль 1	G2	1.557	1.532	1.82
	H2	1.507		
Образец	A3	0.991	0.967	4.71
	B3	0.943		

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

Рисунок 1



## 11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

- Оптическая плотность Калибратора 0 должна быть  $\geq 1.3$
- 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](mailto: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 анализам.
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

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции, ожидаемые значения при использовании метода Unconjugated Estriol AccuBind™ ELISA приведены в таблице 1:

ТАБЛИЦА 1

Ожидаемые значения для У-Эстриола, нг/мл

Мужчины и небеременные Женщины	< 1.0 нг/мл
--------------------------------	-------------

В период беременности уровень u-E3 в сыворотке быстро повышается до конца третьего триместра (см. таблицу 2, литературу).<sup>(6)</sup>

ТАБЛИЦА 2

Неделя гестации	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	Неделя гестации	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	Двуплодная беременность (нг/мл)
12	0.3-1.0	22	2.7-16.0	3.0-18.0
14	0.4-1.6	26	3.0-18.0	4.0-21.0
16	1.4-6.5	32	4.6-23.0	5.0-25.0
18	1.6-8.5	36	7.2-29.0	7.0-39.0
20	2.1 - 13.0	40	8.0-39.0	13.0-40.0

Важно помнить, 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 u-E3 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 3 и 4.

ТАБЛИЦА 3

Воспроизводимость внутри серии (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Низкий	24	1.58	0.13	8.3
Нормальный	24	5.17	0.37	7.1
Высокий	24	9.06	0.59	6.5

ТАБЛИЦА 4

Воспроизводимость между сериями (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Низкий	10	1.47	0.14	9.5
Нормальный	10	4.93	0.39	7.9
Высокий	10	8.99	0.54	6.0

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

### 14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 2.9 пг/Т. Это эквивалентно образцу с концентрацией 0.115 нг/мл для данного набора. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (мкг/дл) плюс 2σ (σ – стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

### 14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным хемилюминесцентным методом. Использовались образцы с низким, средним и высоким содержанием u-E3 (диапазон значений 0.15 – 29.1 нг/мл). Общее число образцов было 158. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для u-E3 ИФА в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	3.84	Y = -0.174 + 0.979 (x)	0.952
Метод сравнения	3.74		

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

Перекрестные реакции антител к эстриолу с различными веществами оценивались добавлением влияющих веществ в сыворотку в различных концентрациях. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой влияющего вещества и дозой u-E3, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Кросс-реактивность
Эстриол	100.0000
Андростендион	0.0001
Кортизол	<0.0001
Кортизон	<0.0001
Кортикостерон	<0.0001
DHEA-S	<0.0001
Дигидротестостерон	0.0001
Эстрадиол	0.0040
Эстриол глюкуронид	<0.0001
Эстриол сульфат	0.6200
Эстрон	0.0004
Преднизон	<0.0001
Прогестерон	<0.0001
Спиrolактон	<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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»