

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСТРОНА

EIA-4174, Estrone

Каталог. № : EIA-4174
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2013
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. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

DRG ESTRONE ELISA KIT - иммуноферментный анализ для количественного определения эстрона в сыворотке или плазме человека.

1.2 Краткое описание и объяснение

Эстрон (3-гидрокси-1,2,3 9 (10)-эстратриен-17-он) – это, помимо эстрадиола и эстриола, один из трех главных обычно обнаруживаемых эстрогенов. Эстрогены влияют на развитие женских половых органов и вторичных половых признаков. Результаты анализа показывают, что эстрогенная активность Эстрона значительно меньше, чем у Эстрадиола. Однако, физиологическая роль эндогенного Эстрона до конца не выяснена. Эстрон продуцируется преимущественно из Андростендиона. У женщин до менопаузы 50% Эстрона секретируется яичниками. У детей препубертатного возраста, мужчин, а также женщин в постменопаузальный период главным источником Эстрона является периферическая тканевая конверсия. Во время фолликулярной фазы менструального цикла уровень Эстрона повышается с четким пиком на 13-й день. Пик длится не долго и к 16-ому дню цикла уровень снова становится низким. Второй пик во время лютеиновой фазы появляется примерно на 21-й день цикла. Если оплодотворения не произошло, выработка эстрогена снова снижается. Эти изменения концентрации Эстрона коррелируют с Эстрадиолом. До 4 – 6 недели беременности Эстрон вырабатывается материнским организмом: яичниками, надпочечниками, периферической конверсией; таким образом, оставаясь в пределах нормальных значений. После 6 – 10 недели значения резко подскакивают из-за начала секреции Эстрона плацентой. После менопаузы уровень Эстрона не снижается так быстро, как уровень Эстрадиола. У постменопаузальных женщин Эстрон – это главный эстроген. У мужчин концентрация E1 по некоторым данным растет с возрастом по сравнению с 17-ОН-прогестероном, который ведет себя наоборот. У пременопаузальных женщин высокий уровень эстрогена может быть при повышенной конверсии андростендиона во время синдроме поликистозного яичника или его опухоли.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор представляет собой твердофазный иммуносорбентный меченный ферментом набор (ELISA), основанный на принципе конкурентного связывания.

Микротитровальные лунки покрыты антителом против антигенного сайта молекулы Эстрона. Эндогенный Эстрон в образце пациента конкурирует с конъюгатом Эстрон - пероксидаза хрена за связывание антитела. После промывки несвязавшийся конъюгат вымывается.

Количество связавшегося конъюгата обратно пропорционально количеству Эстрона в образце. После добавления субстрата интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации Эстрона в образце.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2 поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызвать раздражение кожи и ожоги.

- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протоколу анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставались и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

1. **Планшет с микролунками**, покрытыми биотинилированным Эстроном, 12x8 стрипов (разламываемые), 96 лунок.
2. **Набор стандартов (Стандарт 0-6)**, 7 флаконов/1 мл каждый, готовы к использованию; Концентрации: 0, 13, 40, 100, 220, 500, 1000 пг/мл. Пересчет: пг/мл x 3.69 = пмоль/л. Содержит консервант.
3. **Контроли Высокий и Низкий**, 2 флакона, 1.0 мл каждый, готовы к использованию. Значения и диапазоны контролей см. на этикетке флакона. Содержат консервант.
4. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 14 мл. Готов к использованию. Содержит консервант.
5. **Раствор субстрата** - TMB, 1 флакон, 25 мл. Готов к использованию.
6. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл. 0.5M H₂SO₄. Готов к использованию.
7. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 40X концентрированный, 30 мл.

Примечание: дополнительный нулевой стандарт имеется в наличии по требованию.

4.2 Материалы, необходимые для исследования, но не включенные в набор:

1. Микропланшетный ридер(450±10 нм).
2. Точные микропипетки с одноразовыми наконечниками.
3. Абсорбирующая бумага
4. Дистиллированная или деионизированная вода
5. Таймер
6. Миллиметровая бумага или ПО.

4.3 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8 °C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется. После восстановления любой раствор стандарта может храниться при 2 – 8 °C в течение 8 дней. При -20 °C раствор может храниться значительно дольше. Конъюгат, субстрат, промывочный буфер и нулевой стандарт должны храниться при 2 – 8 °C. Микропланшета должна храниться при 2 – 8 °C. После вскрытия фольгированного пакета при хранении пакет необходимо держать

плотно закрытым. Иммуноактивность лунок сохраняется приблизительно в течение 6 недель при хранении во вскрытом, но плотно закрытом пакете с влагопоглотителем.

4.4 Подготовка реагентов

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

Промывочный раствор

Развести 30 мл концентрированного промывочного раствора с 1170 мл деионизированной воды, общий объем 1200 мл. *Разбавленный промывочный раствор хранится в течение 2 недель при комнатной температуре.*

4.5 Утилизация набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности.

4.6 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотка или плазма (ЭДТА-, гепарин-, или цитрат плазмы) могут использоваться в данном исследовании.

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Примечание: Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в анализе.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь стандартным методом венепункции, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

Плазма:

Собрать всю кровь в центрифужные пробирки с анти коагулянтом и сразу же после забора центрифугировать.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми, их необходимо хранить в течение 5 дней при температуре 2-8°C и должны быть заморожены до -20°C или ниже для хранения в течении более длительного периода. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

5.3 Разведение образцов

В случае если в исходном анализе концентрация в образце больше чем в наивысшем стандарте, образцы необходимо разводить в 10 или 100 раз с нулевым стандартом и исследовать повторно, как описано в процедуре исследования.

Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимание данный фактор разведения образцов.

Например:

- а) разведение 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно перемешать).
б) разведение 1:100: 10 мкл раствор а) 1:10 + 90 мкл нулевой стандарт (тщательно перемешать).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие примечания

- Все реагенты и образцы перед началом исследования должны иметь комнатную температуру. Все реагенты должны быть перемешаны без образования пены.
- После начала исследования все шаги должны быть завершены без остановок
- Для каждого образца, реагента и стандарта необходимо использовать новые одноразовые наконечники пипеток.
- Абсорбция - это функция, линейно пропорциональная инкубационному времени и температуре. До начала исследования рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить в держателе необходимые лунки, и т.д. Этим Вы обеспечите равное время для каждого раскапывания без остановок.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Каждая процедура должна включать стандартную кривую.

1. Установите необходимое количество лунок в держателе.
2. Раскапать по **100 мкл** каждого из **Стандартов, Контролей и образцов** новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки
3. Раскапать **100 мкл Ферментного конъюгата** в каждую лунку. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. На этом этапе важно добиться полного смешивания.
4. Инкубируйте в течение **60 мин** при комнатной температуре.
5. Резко встряхните содержимое лунок. Промыть лунки **4 раза** разведенным *Промывочным раствором* (400 мкл/лунку). Резко постучите плашкой об абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки влаги.
Важно: Точность и чувствительность данного анализа зависят от четко выполненной процедуры промывки!
6. Раскапать **200 мкл Раствора субстрата** в каждую лунку.
7. Инкубировать в течение **15 минут** при комнатной температуре.
8. Установить ферментную реакцию добавлением **100 мкл Стоп раствора** в каждую лунку.
9. Определить абсорбцию (ОП) каждой лунки при **450±10 нм** микропланшетным ридером **в течение 10 минут** после добавления Стоп раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения абсорбции для каждого стандарта, контроля и образца пациента.
2. Постройте стандартную кривую соотношением средней абсорбции (Y) каждого референс-стандарта к соответствующей концентрации (X) в нг/мл.
3. Используя среднюю абсорбцию каждого образца, определите соответствующую величину простой интерполяцией от этой стандартной кривой, при необходимости умножая на коэффициент разведения.
4. Автоматический метод: компьютерные программы, использующие кубический сплайн, 4 PL (4 параметра материально-технического обеспечения) или log-it преобразование.
5. Концентрацию образцов можно считать непосредственно со стандартной кривой. Образцы с концентрацией, превышающей самый высокий стандарт, необходимо разводить еще раз. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимание данный фактор разведения.

6.3.1 Пример типичной стандартной кривой

Стандарт	Оптические величины (450 нм)
Стандарт 0 (0 пг/мл)	2.43
Стандарт 1 (13 пг/мл)	2.04
Стандарт 2 (40 пг/мл)	1.69
Стандарт 3 (100 пг/мл)	1.16
Стандарт 4 (220 пг/мл)	0.69
Стандарт 5 (500 пг/мл)	0.36
Стандарт 6 (1000 пг/мл)	0.18

7. ОЖИДАЕМЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные значения нормы и патологии.

Население	N	5% перцентиль, пг/мл	95% перцентиль, пг/мл
Мужчины	40	42.28	127.15
Женщины	64	32.5	154.85

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Значения и диапазоны, указанные в сертификате контроля качества всегда соответствуют данному лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон данного анализа варьируется от 2.21 – 1000 пг/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие вещества были проанализированы на перекрестную реактивность.

Компонент	Перекрестная реактивность (%)
Прогестерон	0.0
Тестостерон	0.0
Эстрадиол	2.5
Свободный Эстриол	2.1

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была подсчитана с помощью среднего значения + 2 стандартных отклонения двадцати повторных анализов нулевого стандарта, и составила 2.21 пг/мл.

9.4 Точность

9.4.1 Вариативность в анализе

Образец	n	Среднее значение (пг/мл)	Козф. Вариации (%)
1	20	23.4	6.5
2	20	34.0	9.4
3	20	24.9	9.5

9.4.2 Вариативность между анализами

Образец	n	Среднее значение (пг/мл)	Козф. Вариации (%)
1	30	31.4	12.8
2	30	23.7	13.6
3	30	14.7	13.0
4	30	22.9	14.8

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены путем добавления раствора Эстрона с определенными концентрациями.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация, пг/мл	260.7	51.0	90.5
Среднее восстановление, %	95.7	97.5	101.0
Диапазон	от 85.2	85.9	85.0
Восстановления, %	до 101.5	114.6	112.6

9.6 Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация, пг/мл	340.0	572.0	462.0
Среднее восстановление, %	102.9	101.4	104.0
Диапазон	от 96.9	92.6	96.8
Восстановления, %	до 112.4	110.5	111.7

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

10.1 Влияющие вещества

Любое неправильное обращение с образцами или изменение этого анализа может влиять на результаты.

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

10.2 Влияние лекарств

На сегодняшний день нам не известны вещества (лекарства), влияющие на измерение прогормона гепцидина в образце.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

В данном анализе «хук-эффект» не наблюдался.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сыровоточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



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