

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ НЕКОН'ЮГОВАНОГО ЕСТРІОЛУ (u-E3)

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

Каталог. №: 5025-300

Методика від 16-07-2019

Кількість : 96

Версія 4

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

**Використання за призначенням:** Кількісне визначення концентрації некон'югованого (вільного) естріолу в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

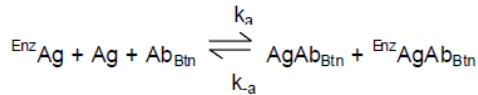
**2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Конкурентний імуноаналіз (тип 7):

Необхідні реагенти, що вимагаються для твердофазного імуноферментного аналізу, включають антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між нативним антигеном зразка та кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{BtN}}$  = біотинильовані антитіла (постійна кількість)

$\text{Ag}$  = нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAg}$  = кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{BtN}}$  = комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{BtN}}$  = комплекс кон'югат-антитіло

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

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

Відбувається реакція між біотином, пов'язаним з антитілами і стрептавідином, іммобілізованим в лунках мікропланшетів. Це дозволяє відокремити фракцію, пов'язану з антитілами, при декантуванні або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{BtN}} + \text{EnzAgAb}_{\text{BtN}} + \text{Стрептавідин}_{\text{HcW}} \Rightarrow$  іммобілізований комплекс

Стрептавідин<sub>HcW</sub> = Стрептавідин, іммобілізований в лунках іммобілізований комплекс = «сендвіч» комплекс, пов'язаний з твердою фазою (поверхнею лунок)

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 в зразках.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

#### А. Калібратори u-E3 – 1 мл/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для некон'югованого Естріолу з концентраціями 0 (А), 0.4 (В), 2.0 (С), 5.0 (D), 15 (Е) і 30.0 (F) нг/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консервант. Концентрації калібраторів можуть бути виражені в молярних концентраціях (нмоль/л) множенням на коефіцієнт 3.45. Наприклад: 1 нг/мл x 3.45 = 3.45 нмоль/л.

#### В. Ферментний реагент u-E3 – 6.0 мл/флакон

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

#### С. Біотиновий реагент u-E3 – 6.0 мл

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до u-E3, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, синій барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °С.

#### Д. Планшет, покритий Стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл стрептавідину і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

#### Е. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

#### Ф. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

#### Г. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

#### Н. Стоп-розчин – 8.0 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

#### І. 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 °С. Набір і стабільність компонентів визначені на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

#### 4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 та 50 мкл з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери для повторного внесення на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%
3. Диспенсери перемінного об'єму 200-1000 мкл для розведення кон'югату
4. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм
6. Фільтрувальний папір для просушування планшета
7. Пластикова плівка чи кришка для інкубації мікропланшета
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання
9. Таймер
10. 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, HCV 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, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

### 6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи гепаринізованої плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівнюваності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натще. Зберіть кров в пробірці для венепункції з червоною кришечкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірку з EDTA 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/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 °С на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °С до 30

днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.050 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 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний буфер

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл. Розбавте до 1000 мл дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі 2-30 °C до 60 днів.

### 2. Розчин робочого субстрату – залишається стабільним протягом 1 року

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте суміш жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть флакон «Робочий розчин субстрату». Розчин зберігається при 2-8 °C.

**Зауваження 1: Не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбав блакитне забарвлення.**

**Зауваження 2: Не використовуйте забруднені реагенти.**

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

**\*\*Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець\*\***

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків в відповідні лунки.
- Додайте піпеткою по 50 мкл розчину u-E3 ферментного реагенту в кожен лунку.
- Добре перемішайте вміст мікропланшета протягом 20-30 секунд.
- Додайте 50 мкл біотинового реагенту u-E3 в кожен лунку.
- Добре перемішайте вміст мікропланшета протягом 20-30 секунд.
- Накрийте його пластиковою плівкою. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури можна використовувати автоматичний або ручний вошер, відповідно до інструкції виробника приладів. При використанні гнучкої пляшки заповнюйте кожен лунку до країв, стискаючи контейнер. Уникайте повітряних бульбашок. Видалити буфер декантуванням і повторити ще два рази.
- Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одному порядку для мінімізації різниці реакційного часу в лунках.

### НЕ СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хв. при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одному порядку для мінімізації різниці реакційного часу в лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

**Зауваження:** Зразки з концентрацією вище 30 нг/мл необхідно розвести в 2 та/або в 5 разів стандартом «0» або чоловічою сироваткою з відомою низькою концентрацією Естріолу. Отриманий результат слід помножити на коефіцієнт розведення 2 або 5 для отримання концентрації в початковому зразку.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації u-E3 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації u-E3 в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
- Визначте невідомі концентрації u-E3 у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.967 перетинає стандартну криву при 4.71 нг/мл (див. мал.1).

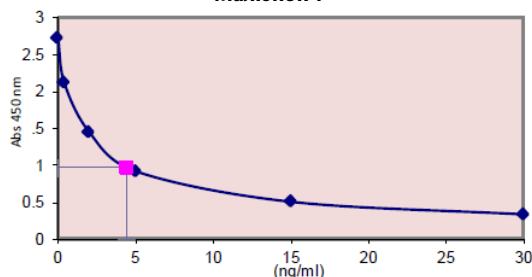
**Примітка:** Програмне забезпечення для обробки даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, може також бути застосоване для обробки даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

### ПРИКЛАД 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.742	2.732	0
	B1	2.722		
Калібратор В	C1	2.155	2.123	0.4
	D1	2.091		
Калібратор С	E1	1.492	1.456	2.0
	F1	1.420		
Калібратор D	G1	0.940	0.921	5.0
	H1	0.903		
Калібратор E	A2	0.523	0.508	15.0
	B2	0.493		
Калібратор F	C2	0.342	0.336	30.0
	D2	0.330		
Контроль 1	G2	1.557	1.532	1.82
	H2	1.507		
Пацієнт 1	A3	0.991	0.967	4.71
	B3	0.943		

\*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:

- Оптична густина Калібратора 0 нг/мл повинна бути  $\geq 1.0$ .
- Чотири з шести контролів якості повинні вкладатися в установлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

### 12.1 Якість набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.

- 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.
- Зразки з концентрацією вище 30 нг/мл необхідно розвести в 2 та/або в 5 разів стандартом «0» або чоловічою сироваткою з відомою низькою концентрацією Естріолу. Отриманий результат слід помножити на коефіцієнт розведення 2 або 5 для отримання концентрації в початковому зразку.
- 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 для даного пристрою може бути наданий Monobind.

## 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, вони є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів", Clin. 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 контрольних інтервалів<sup>5</sup> для "нормальної" дорослої популяції, очікувані діапазони для даної тестової системи AccuBind® ELISA детально описані в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для тест-системи u-E3, нг/мл

Чоловіки і невагітні жінки	< 1.0 нг/мл
----------------------------	-------------

При вагітності рівні сироваткового естрадіолу швидко піднімаються аж до кінця третього триместру. Див. таблицю 2.

ТАБЛИЦЯ 2

Тижень гестації	Очікуваний діапазон (нг/мл)	Тижень гестації	Очікуваний діапазон (нг/мл)	Двохплідна вагітність (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

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 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 3 і 4.

ТАБЛИЦЯ 3  
Точність в аналізі (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	24	1.58	0.13	8.3
Нормальний	24	5.17	0.37	7.1
Високий	24	9.06	0.59	6.5

ТАБЛИЦЯ 4  
Точність між аналізами (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	1.47	0.14	9.5
Нормальний	10	4.93	0.39	7.9
Високий	10	8.99	0.54	6.0

\*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах протягом 10 днів.

### 14.2 Чутливість

Чутливість методу – 2.9 пг/Т для даного набору. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.115 нг/мл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (пг/мл) 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 u-E3 (діапазон значень 0.15-29.1 нг/мл). Загальне число зразків було 158. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 5.

ТАБЛИЦЯ 5  
Лінійна регресія (tT4)

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	3.84	$y = -0.174 + 0.979(x)$	0.952
Референсний	3.74		

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
Естріол	100.0000
Андростендіон	0.0001
Кортизол	<0.0001
Кортизон	<0.0001
Кортикостерон	<0.0001
DHEA-S	<0.0001
Дигідротестостерон	0.0001
Естрадіол	0.0040
Естріол глюкуронид	<0.0001
Естріол сульфат	0.6200
Естрон	0.0004
Преднізон	<0.0001
Прогестерон	<0.0001
Спіролактон	<0.0001
Тестостерон	<0.0001



Monobind, Inc.  
100 North Pointe Drive  
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 [www.monobind.com](http://www.monobind.com)



**УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 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)

