

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов предназначен для количественного определения эстрадиола в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа на твердофазном носителе.

Эстрадиол (эстрадиол-17 β ; 1,3,5 (10)-эстратриен-3,17 β -диол; E2) представляет собой стероидный гормон с молекулярным весом 272,4 дальтон, содержащий в своей структуре фенольное кольцо. Он является наиболее активным природным эстрогеном в системе циркуляции, как женщин, так и мужчин. У женщин детородного возраста эстрадиол образуется в фолликулах яичников под воздействием фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и выделяется в кровь. Около 98% циркулирующего эстрадиола находится в связанном состоянии, оставшееся количество – свободный эстрадиол, – как полагают, является активной формой гормона. Он участвует в процессе продуцирования гонадотропина, стимулирует рост половых органов и развитие вторичных половых признаков.

При нормальном менструальном цикле секреция эстрадиола носит циклический характер и имеет две фазы. Наиболее высокие его концентрации наблюдаются перед овуляцией. У беременных женщин уровень эстрадиола в крови намного выше, чем при нормальном менструальном цикле.

Рекомендуется определять содержание эстрадиола в крови для выявления менструальных дисфункций, таких как преждевременное или позднее половое созревание девушек, первичной или вторичной аменореи, а также менопаузы. Доказано, что высокая концентрация эстрадиола отмечается у пациентов с синдромом феминизации, гинекомастией и опухолью яичек.

Рекомендуется также определять содержание эстрадиола в крови при терапевтическом мониторинге бесплодия (например, при гормональной терапии или экстракорпоральном оплодотворении).

Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая референс-стандарты, на планшете.

Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител.

На стенках лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к области детерминанты молекулы эстрадиола. В лунках планшета эндогенный эстрадиол в образцах исследуемых сывороток и ферментный конъюгат эстрадиола с пероксидазой из корня хрена вступают в конкурентное взаимодействие с иммобилизованными на твердом носителе антителами, и формируется иммуноферментный комплекс. После завершения инкубации избыток несвязавшегося конъюгата удаляют промывкой. Количество связавшегося конъюгата обратно пропорционально концентрации эстрадиола в исследуемом образце.

Образовавшиеся иммуноферментные комплексы выявляют в ходе инкубации с субстратом ТМБ: происходит окрашивание содержимого лунок в синий цвет. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации эстрадиола в исследуемых образцах.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика определяют концентрацию эстрадиола в исследуемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА.

1. Иммуносорбент - 96-луночный разборный планшет для иммуноферментного анализа, содержащий 12 стрипов по 8 лунок, на поверхности которых сорбированы кроличьи поликлональные антитела к эстрадиолу, готовый для использования – 1 шт.;

2. Конъюгат ферментный (Кг)– эстрадиол, конъюгированный с пероксидазой из корня хрена, прозрачная розового или красного цвета жидкость, допускается опалесценция, готовый для использования, 25 мл – 1 фл.;

3. Набор референс-стандартов – образцы сывороток крови человека, инактивированные, с содержанием эстрадиола 0; 25; 100; 250; 500; 1000; 2000 пг/мл, концентрации эстрадиола в референс-стандартах могут незначительно изменяться от серии к серии, точные значения концентраций указаны на этикетках флаконов; прозрачные светло-желтого или розового цвета жидкости, допускается опалесценция, готовые для использования, 1 мл – 7 фл.; (коэффициент перевода: 1 пг/мл = 3,67 пмоль/л);

4. Субстрат-раствор с тетраметилбензидином* - прозрачная бесцветная или со светло-зеленым или светло-голубым оттенком жидкость, готовый для использования, 14 мл – 1 фл.;

5. Стоп-раствор - 0,5М водный раствор серной кислоты, прозрачная бесцветная жидкость, готовый для использования, 14 мл – 1 фл.;

6. Промывочный раствор (концентрат $\times 40$) - прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение кристаллического осадка белого цвета, 30 мл – 1 фл.;

*Примечание: вместо субстратного раствора с тетраметилбензидином СБР-ТМБ-1 в состав набора могут входить:

4а. Субстратный буферный раствор СБР, прозрачная бесцветная жидкость, 14 мл – 1 фл.;

4б. Хромоген – тетраметилбензидин ТМБ, прозрачная бесцветная или светло- желтого цвета жидкость, 2 мл – 1 фл.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды.

Дополнительный флакон «нулевого» референс-стандарта (РС₀) для разведения образцов может поставляться дополнительно по предварительной заявке.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Специфичность. Результаты исследований перекрестной реакции поликлональных антител к эстрадиолу с другими стероидами приведены в таблице.

		<i>Таблица.</i>	
соединение	% перекрестной реакции	соединение	% перекрестной реакции
Эстрадиол-17β	100	11-Деоксикортизол	0
Андростендион	0	21- Деоксикортизол	0
Андростерон	0	Дигидротестостерон	0
Кортикостерон	0	Дигидроэпиандростерон	0
Кортизон	0	20-Дигидропрогестерон	0
Эпиандростерон	0	11-Гидроксипрогестерон	0
16-Эпиэстриол	0	17α- Гидроксипрогестерон	0
Эстрадиол-3-сульфат	0	17α-Прегненолон	0
Эстрадиол-3- глюкоронид	0	17α-Прогестерон	0
Эстрадиол-17α	0	Прегнанеиол	0
Эстриол	0,05	Прегнанетриол	0
Эстриол-16-глюкоронид	0	Прегненолон	0
Эстрон	0,2	Прогестерон	0
Эстрон-3-сульфат	0	Тестостерон	0
Дегидроэпиандростерон	0		

4.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания эстрадиола в одном и том же образце контрольной сыворотки с известным содержанием эстрадиола не превышает 8%.

4.3. Линейность.

Линейность определения концентрации эстрадиола в диапазоне концентраций от 25 до 2000 пг/мл составляет 90-110%.

4.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие». Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая набором концентрация эстрадиола в сыворотке или плазме крови человека не превышает 9,714 пг/мл.

4.6. Динамический диапазон.

Диапазон измерений метода 9,7 - 2000 пг/мл.

4.7. Клиническая проверка.

При исследовании образцов сывороток крови здоровых пациентов с использованием тест-системы «ДРГ Эстрадиол ИФА» были получены следующие значения содержания эстрадиола:

Пациенты	5-95% Перцентиль
Мужчины	10-36 пг/мл
Женщины (пременопауза)	13-191 пг/мл
Женщины (постменопауза)	11-65 пг/мл

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой диапазон нормальных и выходящих за пределы нормы значений.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты исследования.

До настоящего времени не наблюдалось влияния каких-либо лекарств на измерение количества эстрадиола в образце.

В данном наборе хук-эффект не наблюдается.

Интерпретация результатов должна проводиться в сочетании с другими клиническими тестами и диагностическими процедурами.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Набор реагентов “ДРГ Эстрадиол ИФА” биологически безопасен, так как содержит инактивированные образцы сывороток крови человека. Однако при работе с любыми реактивами, содержащими компоненты человеческой крови, в том числе с тестируемыми образцами, их следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, который может содержать вирусы гепатитов, ВИЧ и других возбудителей заболеваний. Поэтому все работы с набором необходимо проводить в резиновых перчатках, избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками, не пипетировать ртом. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Все компоненты набора, за исключением стоп-раствора, в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Стоп-раствор обладает раздражающим действием. Избегать попадания капель стоп-раствора на кожу, слизистые оболочки или в глаза, использовать защитные очки. В случае попадания – необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР.

- спектрофотометр вертикального сканирования (ридер), позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм (например, DRG Instruments Microtiter Plats Reader);
- ручное или автоматическое устройство для отмывания планшетов или 8-канальный полуавтоматический дозатор;
- термостат-инкубатор;
- лабораторный холодильник-морозильник;
- дозаторы переменного объема (одно- и многоканальные) с изменяемой емкостью и с погрешностью измерения не более чем указано в паспорте на данное оборудование;
- наконечники для дозаторов пипеточных одноразовые;
- пластиковые одноразовые ванночки;
- цилиндры мерные;
- таймер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые латексные;
- вода дистиллированная;
- линованная графическая (миллиметровая) бумага.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

В анализе можно исследовать сыворотку или плазму крови.

Не использовать гемолизированные или липидемичные образцы, а также образцы, прошедшие несколько циклов замораживания и оттаивания.

Не использовать растворы или образцы сывороток, содержащие азид натрия.

7.1 Подготовка анализируемых образцов сывороток крови пациентов.

Кровь отобрать венопункцией, дать полностью свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Для свертывания крови пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, может потребоваться больше времени.

7.2 Приготовление анализируемых образцов плазмы.

Сбор крови проводить в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянты, и немедленно после сбора центрифугировать. В качестве антикоагулянтов использовать ЭДТА, гепарин или цитрат натрия.

7.3 Хранение образцов сывороток и плазмы.

Образцы хранить до постановки анализа в закрытых пробирках при температуре от 2 до 8°C не более 24 ч.

Для более долгого хранения образцы необходимо заморозить (не более одного раза!) при температуре минус 20°C. Непосредственно перед проведением анализа образцы необходимо прогреть до комнатной температуры (от 20 до 25°C) и тщательно перемешать. Не допускать повторного замораживания исследуемых образцов!

7.4. Разведение образцов сывороток и плазмы.

Перед проведением анализа образцы, в которых концентрация эстрадиола оказалась больше самого высокого значения референс-стандарта, либо образцы с предполагаемой очень высокой концентрацией эстрадиола необходимо развести «нулевым» референс-стандартом.

Пример:

а) Разведение 1:10: 10 мкл исходного образца + 90 мкл «нулевого» референс-стандарта (тщательно перемешать)

б) Разведение 1:100: 10 мкл образца, разведенного, как указано в пункте а) + 90 мкл «нулевого» референс-стандарта (тщательно перемешать).

7.5. Приготовление дополнительных контрольных сывороток.

Лиофилизированные сыворотки контрольной панели разводить требуемым количеством дистиллированной воды и использовать в соответствии с инструкцией по их применению.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Общие замечания и предупреждения при работе с набором.

- Реагенты набора стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке, только при температуре хранения от 2 до 8°C.

- Необходимо пользоваться новым одноразовым наконечником для каждого образца.

- Запрещается использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.

- Не путать колпачки реагентов во избежание кросс-контаминации.

- Плотно закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.

- Пипетировать стандарты и образцы на дно лунок. Для пипетирования ферментного конъюгата и стоп-раствора рекомендуется держать пипетку вертикально над лункой и раскапывать соответствующий раствор в центр лунки для достижения полного смешивания.

- Все реагенты и требуемое количество стрипов (или планшетов) до начала анализа выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре (от 20 до 25°C). Все реагенты необходимо перемешать, избегая появления пены. Упаковку планшета необходимо вскрывать только по истечении указанного времени прогрева, чтобы избежать конденсации влаги на охлажденной поверхности лунок, приводящей к их порче.

- Как правило, ферментная реакция прямо пропорциональна времени и температуре, поэтому перед началом анализа рекомендуется составить план расположения для всех референс-стандартов, контрольных и исследуемых образцов, рассчитать и отобрать необходимое для анализа количество стрипов, закрепить их в держателе, подготовить все реагенты и т. д. Это обеспечит равные промежутки времени при раскапывании и проведении анализа.

- Субстрат-раствор должен быть бесцветным или иметь светло-зеленый или светло-голубой оттенок. Если этот реагент имеет темно-синий цвет, то его нельзя использовать.

- Во время инкубации с субстрат-раствором с ТМБ не допускать попадания на стрипы прямых солнечных лучей.

- После начала анализа все этапы необходимо проводить без перерывов.

8.2. Приготовление рабочих растворов.

8.2.1. Промывочный рабочий раствор. При наличии в концентрате промывочного раствора осадка солей содержимое флакона прогреть перед разведением при температуре от 35 до 37°C до полного растворения осадка. Для приготовления промывочного рабочего раствора содержимое флакона с ПРк (промывочным раствором 40-кратным концентратом, содержит 30 мл) перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 1200 мл дистиллированной водой. Полученный раствор тщательно перемешать. Хранить промывочный рабочий раствор не более 2 недель при комнатной температуре (от 18 до 25°C).

8.2.2. Рабочий субстратный буферный раствор с тетраметилбензидином (только при комплектации набора 2-х компонентным субстратом: (СБР и ТМБ). 10,5 мл субстратного буферного раствора (СБР) перенести в чистую посуду из темного стекла или в одноразовую пластиковую посуду и добавить 1,5 мл хромогена - ТМБ, тщательно перемешать. Соблюдать последовательность внесения. Исключить контакт с металлической поверхностью или с ионами металлов. Избегать прямого солнечного света. Раствор хранению не подлежит, готовить непосредственно перед внесением в лунки планшета.

8.3. Проведение ИФА.

8.3.1. Внести, используя для каждого образца новый наконечник для пипеток, по **25 мкл** референс-стандартов, контролей и исследуемых образцов сывороток крови в соответствующие лунки.

8.3.2. Внести в каждую лунку по **200 мкл** ферментного конъюгата.

8.3.3. Тщательно перемешать в течение **10 сек.** Важно добиться полного смешивания реагентов.

8.3.4. Инкубировать в течение **120 мин** при комнатной температуре (от **20** до **25°C**). Планшет не накрывать!

8.3.5. Удалить содержимое лунок в сосуд для сбора отработанных растворов (с последующей дезинфекцией содержимого сосуда).

Промыть лунки **3 раза** промывочным рабочим раствором (см.п.8.2.1), внося около 400 мкл на лунку, не допуская переливания раствора из лунки в лунку. Время между внесением раствора и его удалением из лунки должно быть не менее 30 сек. Для получения надежных результатов анализа очень важно следить за качеством промывки. Чувствительность и специфичность анализа напрямую зависят от качества отмытки лунок планшета.

Остатки раствора удалить и полностью осушить планшет, резко постукивая в перевернутом положении по сложенной в несколько раз чистой фильтровальной бумаге, помещенной в лоток.

8.3.6. Внести в каждую лунку по **100 мкл** субстрат-раствора с тетраметилбензидином (СБР-ТМБ-1), а при комплектации набора 2-х компонентным субстратом: (СБР и ТМБ) - рабочего субстратного буферного раствора с тетраметилбензидином (см.п.8.2.2).

8.3.7. Инкубировать в течение **15 мин** при комнатной температуре (от **20** до **25°C**) в защищенном от света месте.

8.3.8. Остановить ферментную реакцию, добавив в лунки по **50 мкл** стоп-раствора.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре не позднее, чем через **10 мин** после внесения стоп-раствора. Оптическую плотность всех ячеек измеряют при длине волны **450±10 нм**. Рекомендуется использование референс-светофильтра с длиной волны 630 нм.

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.

Определение концентрации эстрадиола в каждом исследуемом образце проводить следующим образом:

10.1. Рассчитать средние значения оптической плотности стандартов, контрольных и исследуемых образцов.

10.2. Используя линованную графическую бумагу, построить стандартную кривую, поместив среднюю величину оптической плотности для каждого референс-стандарта на вертикальной оси (Y) против соответствующей концентрации в пг/мл на горизонтальной оси (X).

10.3. Использовать средние значения оптической плотности для каждого образца для определения

соответствующей концентрации эстрадиола путем простой интерполяции по стандартной кривой, при необходимости умножая на коэффициент разведения.

10.4. При использовании автоматического метода результаты анализа рассчитываются автоматически, используя логарифмическую логистическую модель с четырьмя параметрами (4PL).

10.5. Образцы с концентрациями более высокими, чем концентрация самого высокого референс-стандарта, необходимо развести (пример разведения см. п.7.4.) и повторить исследование.

Программы DRG ELISA MAT 3000 и DRG Regression Program позволяют считывать и обрабатывать результаты с помощью компьютера.

10.6. Следующие данные приведены только для иллюстрации и не должны использоваться для вычисления результатов.

Референс-стандарт	ОП (450 нм)
Стандарт 0 (0 пг/мл)	2,40
Стандарт 1 (25 пг/мл)	1,92
Стандарт 2 (100 пг/мл)	1,25
Стандарт 3 (250 пг/мл)	0,72
Стандарт 4 (500 пг/мл)	0,48
Стандарт 5 (1000 пг/мл)	0,30
Стандарт 6 (2000 пг/мл)	0,21

Значения референс-стандартов и соответствующие результаты лаборатории контроля качества указаны в листе контроля качества (паспорте ОТК), вложенном в набор. Значения и диапазоны, указанные на листе контроля качества, всегда относятся к текущей серии набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для того, чтобы удостовериться в правильности получаемых результатов. Рекомендуется проводить контроли с каждой калибровочной кривой, используя Lymphochek Immunoassay Plus Control Levels 1, 2 and 3 для ИФА производства «Био-Рад», (кат. № № 371, 372, 373), которые также можно приобрести в компании ЗАО «ДРГ Техсистемс».

Соответствующие статистические методы также можно использовать для анализа контрольных значений и тенденций.

Любое ненадлежащее обращение с образцами или модификация данного метода могут повлиять на результаты исследования.

Если результат анализа не укладывается в рамки установленных приемлемых диапазонов контрольных материалов, результаты пациентов считаются недействительными. В этом случае необходимо проверить следующее: приборы для пипетирования – дозаторы пипеточные, наличие их поверки и калибровки, исправность и наличие поверки фотометра (ридера), сроки годности всех реагентов, условия хранения и инкубации, качество промывки.

В том случае, если проверка всех вышеупомянутых моментов не выявила никаких нарушений, необходимо обратиться к производителю - ЗАО «ДРГ Техсистемс».

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

12.1. Набор реагентов “ДРГ Эстрадиол ИФА” должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8°C, в сухом, защищенном от света месте и относительной влажности воздуха не более 70% в течение всего срока годности. Срок годности набора – 12 месяцев.

12.2. Категорически запрещается замораживать набор или его отдельные компоненты.

12.3. В случае дробного использования набора неиспользованные стрипы необходимо хранить в плотно закрытой исходной упаковке (фольгированном пакете с осушителем-силикагелем), удалив из него воздух. Иммунореактивность лунок после первого вскрытия пакета с планшетом сохраняется не более 6 недель при последующем хранении при температуре от 2 до 8°C в плотно запечатанном пакете с осушителем. Жидкие, готовые к использованию реагенты набора после первого вскрытия флакона стабильны в течение 6 недель при условии хранения в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C.

12.4. Запрещается использовать вместе стрипы из разных серий. Не рекомендуется также использовать в одном анализе стрипы разных планшет даже из одной серии, так как разные наборы могли храниться или транспортироваться при разных условиях, в результате чего связывающие свойства планшет могут немного различаться.

12.5. Не допускается использование реагентов после окончания срока годности, указанного на этикетке.

12.6. Запрещается использовать реагенты других фирм-производителей.

12.7. Не допускать контакта субстрат-раствора с ТМБ и стоп-раствора с металлическими поверхностями и ионами металлов.

12.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

12.9. Транспортирование – при температуре от 2 до 8°C. Допускается хранение либо транспортирование наборов при температуре от 9 до 25°C не более 72 ч.

12.10. Условия отпуска – только для диагностики *in vitro*, для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.