

**1. НАЗНАЧЕНИЕ.**

Набор реагентов «ДРГ Эстриол свободный ИФА» предназначен для количественного определения свободного (неконъюгированного) эстриола в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа на твердофазном носителе.

Эстриол (Е3) – главный эстроген, образуемый фетоплацентарной единицей. Свободный эстриол проходит через плаценту в кровотоки матери, где практически сразу переходит в соединения глюкуронид и сульфат и экскретируется с мочой. Период полураспада эстриола в материнском кровотоке составляет лишь 20-30 минут. Его измерение позволяет быстро и удобно оценить состояние плода. Эстриол в плазме крови монотонно увеличивается в течение беременности и особенно резко возрастает в третьем триместре (28-40 недель). Внезапное понижение фетоплацентарной продукции Е3 приведет к резкому падению Е3 в сыворотке крови матери. Есть несколько преимуществ измерения свободного Е3 перед измерением общего Е3 в моче или сыворотке. Уровень свободного эстриола не зависит от эффектов, которые могут на него оказать печеночные или почечные дисфункции. Неконъюгированный Е3 более актуально отображает возможность выкидыша при беременности с диабетом. Так как не требуется гидролиза несвязанного Е3, то результат можно получить быстрее.

Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая референс-стандарты, на 1 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 эстриолу. В лунках планшета эндогенный эстриол в образцах исследуемых сывороток и эстриол-конъюгат 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.

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

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика определяют концентрацию свободного эстриола в анализируемых образцах.

**3. СОСТАВ НАБОРА**

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

2. Конъюгат ферментный (Кг)– эстриол, конъюгированный с пероксидазой из корня хрена, прозрачная бесцветная или розового цвета жидкость, допускается опалесценция, готовый для использования, 14 мл – 1 фл.;

3. Набор референс-стандартов – образцы сывороток крови человека, инактивированные, с содержанием эстриола 0; 0,3; 1,2; 4,0; 15,0; 40,0 нг/мл, концентрации эстриола 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 – 6 фл.;

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 ×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 (РС<sub>0</sub>) для разведения образцов сывороток может поставляться дополнительно по предварительной заявке.

**4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.**

**4.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции поликлональных антител к эстриолу с другими стероидами. Результаты исследования приведены в таблице.

*Таблица.*

Исследуемый стероид	Концентрация стероида, нг/мл	Измеренная концентрация, нг/мл
Эстриол (Е3)	40	39,67
Тестостерон	16	0
Эстрадиол (Е2)	2	0
Эстрон (Е1)	2	0
Кортизол	800	0

**4.2. Воспроизводимость.**

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

**4.3. Линейность.**

Линейность определения концентрации свободного эстриола в диапазоне концентраций от 0,3 до 40 нг/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 свободного эстриола в сыворотке крови человека не превышает 0,075 нг/мл.

**4.6. Динамический диапазон.**

Диапазон измерений метода 0 - 40 нг/мл.

**4.7. Клиническая проверка.**

При исследовании образцов сывороток крови здоровых пациентов с использованием тест-системы «ДРГ Эстриол свободный ИФА» были получены следующие значения содержания свободного эстриола:

население	Количество испытуемых	5 %Перцентиль, нг/мл	95 %Перцентиль, нг/мл
мужчины	42	0,146	0,573
женщины (не беременные)	43	0,057	0,822

Нормы в течение беременности:

Неделя беременности	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	Неделя беременности	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	многоплодная беременность (нг/мл)
12	0,3-1,0	22-23	2,7-16	3-18
13	0,3-1,1	24-25	2,9-17	3-20
14	0,4-1,6	26-27	3,0-18	4-21
15	1,0-4,4	28-29	3,2-20	4-22
16	1,4-6,5	30-31	3,6-22	5-25
17	1,5-6,6	32-33	4,6-23	6-39
18	1,6-8,5	34-35	5,1-25	7-39
19	1,9-11	36-37	7,2-29	9-38
20	2,1-13	38-39	7,8-37	13-40
21	2,6-14	40-42	8,0-39	-

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

В данном наборе хук-эффект не наблюдается.

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

Определение эстриола (Е3) в сыворотке крови имеет большое клиническое значение. Оно используется для мониторинга и контроля развития плода, у женщин во второй половине беременности, особенно входящих в группу риска (при беременности с диабетом, привычное невынашивание, семейное носительство хромосомных болезней и т. д.).

Уровень свободного эстриола постоянно повышается до 20 недели и резко возрастает в третьем триместре. Однократное определение уровня свободного эстриола в плазме недостаточно информативно, так как диапазоны нормальных и патологических значений очень широки. Поэтому пациентам необходим постоянный контроль (мониторинг) для выявления индивидуальной предрасположенности.

Постоянное низкое значение или резкое падение уровня свободного эстриола в третьем триместре с большой точностью указывает на патологическое состояние плода или его возможную гибель. При получении таких результатов необходимо провести альтернативные методы оценки состояния плода.

Отклонение от нормы уровня свободного эстриола встречается у пациентов, принимающих антибиотики или кортикостероиды или у пациентов со сниженной функцией печени.

Интерпретация результатов должна проводиться в сочетании с другими клиническими тестами и диагностическими процедурами, такими как амниоцентез и ультразвук.

#### 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Набор реагентов "ДРГ Эстриол свободный 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.

##### 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.

Не использовать гемолизированные или липидемичные образцы, а также образцы сывороток крови, прошедших несколько циклов замораживания и оттаивания.

Не использовать растворы или образцы сывороток, содержащие азид натрия.

##### 7.2 Хранение образцов сывороток.

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

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

##### 7.3. Разведение образцов сывороток.

Перед проведением анализа образцы, в которых концентрация оказалась больше самого высокого значения референс-стандарта, либо образцы с предполагаемой очень высокой концентрацией 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 п. а) + 90 мкл «нулевого» референс-стандарта (тщательно перемешать).

##### 7.4. 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 **10 мкл референс-стандартов, контролей и исследуемых образцов** сывороток крови в соответствующие лунки.

**8.3.2.** Внести в каждую лунку по **100 мкл ферментного конъюгата**.

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

**8.3.4.** Инкубировать в течение **60 мин** при комнатной температуре (от **20 до 25°C**).

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

Промыть лунку **4 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 отмывки 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 **30 мин** при комнатной температуре (от **20 до 25°C**), в **защищенном от света** месте.

**8.3.8.** Остановить ферментную реакцию, добавив в лунки по **100 мкл стоп-раствора**.

**9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.**

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре в течение **10 мин** после внесения стоп-раствора. Оптическую плотность всех лунок измеряют при длине волны **450±10 нм**. Рекомендуется использование референс-светофильтра с длиной волны 630 нм.

**10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.**

Определение концентрации свободного эстриола в каждом образце сыворотки крови пациента проводить следующим образом.

**10.1.** Рассчитать средние значения оптической плотности референс-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 нг/мл на горизонтальной оси (X).

**10.3.** Использовать средние значения оптической плотности для каждого образца для определения соответствующей концентрации свободного эстриола 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. 7.3.) 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 нг/мл)	1,79
Стандарт 1 (0,3 нг/мл)	1,48
Стандарт 2 (1,2 нг/мл)	1,18
Стандарт 3 (4,0 нг/мл)	0,81
Стандарт 4 (15,0 нг/мл)	0,52
Стандарт 5 (40,0 нг/мл)	0,38

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

### 11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

11.1. Набор реагентов “ДРГ Эстриол свободный 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.

11.2. Категорически запрещается замораживать набор или его отдельные компоненты.

11.3. 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 2 месяцев 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 2 месяцев при условии хранения в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C.

11.4. 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.

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

11.6. Запрещается использовать реагенты других фирм-производителей.

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

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

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

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