

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2012 г.

№ _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Лебедин Ю.С.

М.П.

«15» мая 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения неконъюгированного (свободного) эстриола в сыворотке крови человека методом лантанидного иммунофлуоресцентного анализа «свЭСТРИОЛ-ЛИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «свЭСТРИОЛ-ЛИФА» предназначен для количественного определения содержания неконъюгированного (свободного) эстриола (далее по тексту - *свЭСТРИОЛ*) в сыворотке крови человека методом лантанидного иммунофлуоресцентного анализа (ЛИФА).

1.2. свЭСТРИОЛ - стероидный гормон с молекулярным весом 99,7 Да. Это один из наиболее активных из эстрогенов в организме человека. Представляет собой стероидный гормон. Синтезируется в плаценте, основой для формирования гормона являются биохимические компоненты печени плода. При отсутствии беременности определяется в крови в очень низкой концентрации. Во время беременности, наоборот, начиная с периода формирования плаценты концентрация гормона резко возрастает. Синтез гормона проходит в течение всей беременности. Под его действием происходит усиление объемного кровотока по маточным сосудам. Так же он участвует в процессе дифференцировки протоков молочных желез. При нормальном течении беременности уровень свЭСТРИОЛа постоянно повышается. В лабораторной диагностике его определение основано на отражении нарушений функции фето-плацентарной системы.

1.3. При снижении уровня этого гормона, возможно, будут иметь место различные нарушения функционирования плацентарного аппарата. Кроме того, в пренатальной диагностике определение уровня свЭСТРИОЛа входит в различные тесты для определения риска течения беременности.

Исследовать уровень этого гормона показано при носительстве хромосомных болезней; при генетических нарушениях, возникших при прошлых беременностях; при радиационных облучениях отца или матери; при невынашивании беременности, при определении патологии плода и плаценты при УЗИ.

Кроме того, тест рекомендуется проводить, если возраст родителей превышает 35 лет у матери и 40 лет у отца.

1.4. Повышение уровня свЭСТРИОЛа встречается при многоплодной беременности и крупном плоде. Снижение уровня характеризует угрозу прерывания беременности, пузырный занос, фето-плацентарную недостаточность. Также снижение его уровня встречается при синдроме Дауна,

различных внутриутробных инфекциях и пороках развития плода, иногда при приеме антибиотиков и гормонов.

1.5. Диагностическая значимость определения.

Определение содержания свЭСТРИОЛа в сыворотке крови человека новорожденных используется для проведения неонатального скрининга на ряд врожденных патологий.

1.6. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

1.7. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

1.8. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип определения. Определение свЭСТРИОЛа основано на использовании конкурентного варианта лантанидного иммунофлуоресцентного анализа (ЛИФА). На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышинные моноклональные анти-свЭСТРИОЛ антитела. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца (экстракт сухого пятна крови), во время инкубации, одновременно происходит конкурентное связывание свЭСТРИОЛа, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе (планшет) и меченного ионами европия Eu^{3+} свЭСТРИОЛа (конъюгат). Во время инкубации с усиливающим раствором происходит выход ионов европия в раствор. Интенсивность флуоресценции обратно пропорциональна концентрации свЭСТРИОЛа в исследуемом образце. Концентрацию свЭСТРИОЛа в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости интенсивности флуоресценции от содержания свЭСТРИОЛа в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора. В состав Набора входят следующие компоненты:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипированный с сорбированными мышинными моноклональными анти-свЭСТРИОЛ антителами (далее по тексту - *планшет*);
- 6 калибровочных проб, содержащих известные количества свЭСТРИОЛа: 0; 1,0; 4,0; 12; 40 и 120 нмоль/л;
- контрольная сыворотка;
- конъюгат;
- усиливающий раствор;
- ЛИФА-Буфер;
- концентрат отмывочного раствора;
- липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета;
- аналитический паспорт (паспорт контроля качества);
- Инструкция по применению.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Использование подобранной на испытательной базе ООО «ХЕМА» пары мышинных моноклональных антител к различным эпитопам молекулы свЭСТРИОЛа человека позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «свЭСТРИОЛ-ЛИФА» концентрация белка свЭСТРИОЛа в сыворотке крови не превышает 0,005 нмоль/л.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания свЭСТРИОЛа в исследуемых образцах сыворотки крови с использованием Набора реагентов «свЭСТРИОЛ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свЭСТРИОЛа - соответствие измеренной концентрации свЭСТРИОЛа предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 4,0 нмоль/л.

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации свЭСТРИОЛа в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей белка свЭСТРИОЛа, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1,0-120 нмоль/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Нижний предел, нмоль/л	Верхний предел, нмоль/л
Мужчины	0,1	2,0
Женщины	0,17	3,0
Беременные неделя:		
22-23	10,0	40
24-25	11	49
26-27	12,5	55,7
28-29	12,8	62
30-32	14,5	65,8
33-34	19,8	80,6
35-36	24,3	104
37-38	31	>100
39-40	33	>100
40-42	35	>100

В соответствии с требованиями **GLP** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «свЭСТРИОЛ-ЛИФА» уточнить значения концентрации свЭСТРИОЛа, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- флуориметр с временным разрешением для планшет (фирма «LKB Wallac», Финляндия, кат. № 1234-931-04);
- промывающее устройство для планшет (фирма «Wallac OY», Финляндия, кат. № 1296-024);
- встряхиватель (шейкер) для планшет (фирма «Wallac OY», Финляндия, кат. № 1296-001);
- устройство (диспенсер) для внесения усиливающего раствора в лунки планшета (фирма «Wallac OY», Финляндия, кат. № 1296-041);
- дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми пластиковыми наконечниками с фиксированным или переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 5,0-250 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (отклонение не более 3,0%);
- холодильник бытовой;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- колба мерная вместимостью 500 мл (ГОСТ 25336-82Е).

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре $+18-25^{\circ}\text{C}$ не менее 30 мин.

7.2. Образцы сыворотки крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре минус 20°C не более 2 недель.

7.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

7.4. Избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

7.5. Перед проведением анализа каждый исследуемый образец тщательно перемешать.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Извлечь Набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

8.2. ЛИФА-Буфер и усиливающий раствор и калибровочные пробы, готовы к использованию. Содержимое флаконов с одинаковой маркировкой следует объединить.

8.3. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в оригинальной упаковке предприятия-производителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ до конца срока годности Набора.

8.4. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 198 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 суток или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 суток.

Оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

8.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Во флакон с конъюгатом внести 1,0 мл воды дистиллированной, тщательно перемешать, избегая вспенивания.

Рабочий раствор конъюгата необходимо использовать в течение 1 ч после приготовления; длительному хранению не подлежит.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

9.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

9.2. Во все лунки планшета внести по 200 мкл **рабочего раствора конъюгата**. Первый объем **рабочего раствора конъюгата** следует отбросить. При внесении **рабочего раствора конъюгата** нельзя касаться наконечником дозатора края лунок и поверхности жидкости.

Внесение **рабочего раствора конъюгата** в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

9.3. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета инкубировать в течение 2 мин при постоянном встряхивании (800 об/мин) при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$), после чего инкубировать в течение 1 ч при постоянном встряхивании (600 об/мин) при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$).

9.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки 5 раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 250 мкл отмывочного раствора, перемешать содержимое планшета круговыми

движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.5. Во все лунки планшета внести по 200 мкл усиливающего раствора с помощью устройства для внесения усиливающего раствора. Перед внесением усиливающего раствора отбросить 10-15 вносимых объемов. При внесении усиливающего раствора не касаться краев лунок или их содержимого.

Внесение усиливающего раствора в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

9.6. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета инкубировать в течение 5 мин при постоянном встряхивании (600 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C), после чего инкубировать в течение 15 мин при без встряхивания при комнатной температуре (+18-25°C).

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить интенсивность флуоресценции (ИФ) на флуориметре с временным разрешением при длине волны 615 нм.

Измерение ИФ в лунках планшета необходимо произвести в течение 1 ч после окончания реакции.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

11.1. Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах: ось абсцисс ($0x$) - десятичный логарифм концентрации свЭСТРИОЛа в калибровочных пробах, ось ординат ($0y$) - ИФ калибровочных проб (ИФ₆₁₅).

11.2. Определить по калибровочному графику содержание свЭСТРИОЛа в исследуемых образцах.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

12.1. Транспортирование Наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование Наборов при температуре до 25°C не более 5 суток

12.2. Хранение Наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться в течение всего срока годности при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование Наборов при температуре до 25°C не более 5 суток.

12.3. Срок годности Набора - 12 месяцев.

12.4. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы планшета тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- ЛИФА-Буфер, калибровочные пробы, контрольную сыворотку, усиливающий раствор после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (18-25 °С) не более 2 суток или при температуре 2-8 °С не более 10 суток;

- концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- **рабочий раствор конъюгата**, необходимо использовать в течение 1 ч после приготовления; хранению не подлежит.

12.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «свЭСТРИОЛ-ЛИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Кострикин
«15» мая 2012г.
М.П.



«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В. В. Долгов

10.07.12

Подпись	
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись	
" " 20__ года	