

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г.

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор ООО «Хема-Медика»

Ю. С. Лебедин

2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения

эстрадиола в сыворотке и плазме крови

«ЭСТРАДИОЛ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Эстрадиол (ЭСТ) – стероидный гормон с молекулярным весом 272.4 Да. Это наиболее активный из эстрогенов в организме человека. Считается, что у мужчин незначительное количество эстрадиола вырабатывается в коре надпочечников и в яичках. В женском организме он образуется в яичниках, оболочке и гранулезных клетках фолликулов. Физиологическая роль ЭСТ заключается в формировании специфических функций женского организма. Секреция ЭСТ регулируется взаимодействием гормонов гипоталамуса, гипофиза и яичников при участии либеринов, гонадотропинов, пролактина и половых стероидов.

1.2. Уровень эстрадиола остается низким в начале и середине фолликулярной фазы нормального менструального цикла. За 3-5 дней до пика ЛГ уровень ЭСТ начинает расти и достигает максимального значения примерно за 12 часов до пика ЛГ. После резкого падения до минимальных значений (спустя 48 часов после пика ЛГ), уровень ЭСТ начинает снова расти. Максимальная концентрация гормона в лютеиновой фазе наблюдается на 9-й день после овуляции, а к концу цикла вновь падает по мере атрезии желтого тела.

1.3. Во время беременности определение уровня эстрадиола в крови позволяет контролировать состояние фетоплацентарной системы. Содержание ЭСТ в крови матери в начале беременности соответствует его содержанию у небеременных женщин во время овуляции. Резкий подъем его уровня наблюдается к 9-й – 10-й неделе (в 12 раз), затем постепенно увеличивается до конца беременности. Снижение концентрации эстрадиола при динамическом исследовании является показателем нарушения развития плода.

1.4. Повышенные уровни эстрадиола в сыворотке крови наблюдаются при маточных кровотечениях в период менопаузы; гиперплазии надпочечников; эстрогенпродуцирующих опухолях; циррозе печени; феминизации у детей; приеме гонадотропинов, кломифена, эстрогенов.

1.5. Снижение уровня эстрадиола наблюдается при синдроме Тернера, первичном и вторичном гипогонадизме, гермафродитизме, климактерическом и постклимактерическом синдромах, нарушении состояния плода во время беременности, приеме оральных контрацептивов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. В данном Наборе используется принцип конкурентного иммуноферментного анализа. В лунки микропланшета, на поверхности которых адсорбированы специфические анти-ЭСТ-антитела, вносят исследуемый образец и конъюгат ЭСТ-пероксидаза. ЭСТ из образца конкурирует с конъюгированным антигеном за связывание с антителами на поверхности лунки. После отмывки активность фермента, связанного с поверхностью лунки микропланшета, проявляется и измеряется добавлением раствора субстрата, стоп-раствора и фотометрией при 450 нм. Интенсивность цветной реакции обратно пропорциональна количеству антигена в образце.

2.2. Состав Набора:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипированный, с сорбированными на внутренней поверхности лунок моноклональными анти-ЭСТ-антителами - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ЭСТ - 0; 0,1; 0,3; 1; 3 и 20 нмоль/л ЭСТ; концентрации ЭСТ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов), готовы к использованию - 6 пробирок или флаконов (по 1,0 мл каждая);
- конъюгат, готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ЭСТ, готова к использованию - 1 пробирка или флакон (1,0 мл);
- концентрат отмывочного раствора - 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент, готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- липкая лента на бумажной подложке для заклеивания планшета - 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Использование моноклональных антител к ЭСТ позволяет достичь высокую специфичность анализа.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ЭСТ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ЭСТРАДИОЛ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ЭСТ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ЭСТ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,1-20 нмоль/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ЭСТ - соответствие измеренной концентрации ЭСТ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,3 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором концентрация

ЭСТ не превышает 0,05 нмоль/л.

3.6. Клиническая проверка.

Исследуемая группа	Нижний предел, нмоль/л	Верхний предел, нмоль/л
Дети до 11 лет	0	0,029
Мужчины	0,029	0,194
Женщины		
Фазы цикла:		
фолликулярная	0,14	0,7
лютеиновая	0,17	1,1
овуляция	0,34	1,8
менопауза	0	0,13

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании Набора уточнить значения концентрации, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые следует смыть кислоту большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила 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.).

4.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

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

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 25; 100 и 250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25$ °C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре -20°C не более 2 недель. Не допускается повторное замораживание-оттаивание анализируемых образцов. При несоблюдении этих условий возможно резкое снижение уровня ЭСТ в исследуемых образцах.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

6.3. Исключается использование для анализа образцов крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.4. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации ЭСТ в контрольной сыворотке.

6.5. 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, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

6.6. Приготовление отмывочного раствора.

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

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 10 раз (1 объем концентрата + 9 объемов дистиллированной воды).

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 120 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$.

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

или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки необходимо произвести в течение 1-2 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 15-25 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.5. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в не позднее 5 мин после внесения стоп-реагента.

В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре, планшет можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 4 ч.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс – логарифм концентрации ЭСТ в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат – оптическая плотность калибровочных проб (OP_{450}).

9.2. Определить по калибровочному графику содержание ЭСТ в анализируемых пробах.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «ЭСТРАДИОЛ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается хранение Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

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

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;
- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес;
- стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение

всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес; при необходимости более длительного хранения - при температуре -20°C в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 дней или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 дней;

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

10.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «ЭСТРАДИОЛ-ИФА», следует обращаться в ООО «Хема-Медика» по адресу: 125319, Москва, 4-я ул. 8 Марта, д. 3, стр.3, тел/факс (095) 1523160; 1523731.

Руководитель исследовательского

отдела ООО «Хема-Медика»



Д.С. Кострикин

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой

лабораторной диагностики

ГОУ ДПО РМАПО Росздрава



д.м.н., профессор В.В. Долгов

