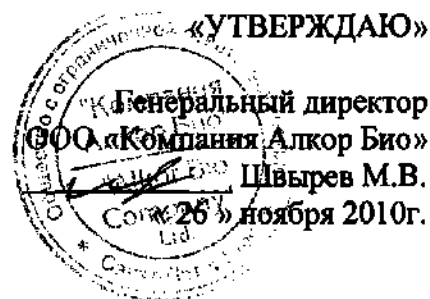


«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от «__» ____ 20__ г. № ____



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЭСТРАДИОЛА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«СтероидИФА-эстрадиол»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-эстрадиол» предназначен для количественного определения эстрадиола в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Эстрадиол – половой С-18-стероидный гормон с молекулярной массой 272,4 Да. Эстрадиол является наиболее активным эндогенным эстрогеном. Он продуцируется в женском организме в основном яичниками и плацентой, а в мужском, в меньших количествах, корой надпочечников и семенниками.

Содержание эстрадиола в периферической крови определяют для выявления причин нарушения менструального цикла, при бесплодии, недостаточности функции половых желез, при подозрении на эстрогенпродуцирующие опухоли. Повышение уровня эстрадиола в сыворотке крови наблюдается при феминизации у детей, опухолях гонад и коры надпочечников, гинекомастии, циррозе печени, гипертиреозе.

1.3. Набор «СтероидИФА-эстрадиол» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «СтероидИФА-эстрадиол» использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. При одновременном добавлении в лунки исследуемого образца и конъюгата эстрадиол-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным эстрадиолом сыворотки или плазмы крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству эстрадиола в исследуемом образце (Рисунок 1).

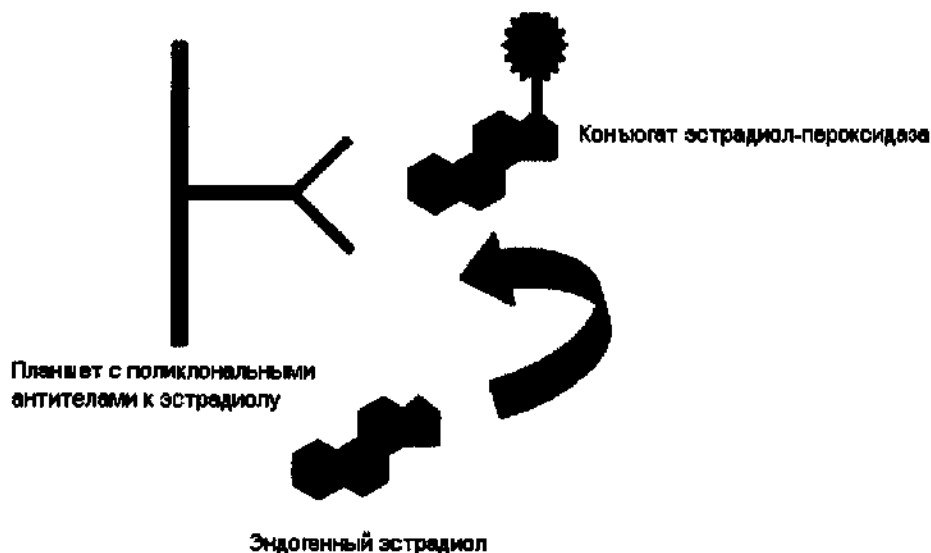


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации эстрадиола в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация эстрадиола в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок поликлональными антителами к эстрадиолу, маркирован «Стрипы с поликлональными антителами к эстрадиолу» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества эстрадиола. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций эстрадиола в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные — 0; 90; 450; 1300; 3800; 7500 пмоль/л — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 1,0 мл);
- конъюгат эстрадиол-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (9 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);

- контрольная сыворотка с известным содержанием эстрадиола, маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 1,0 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к эстрадиолу с другими стероидами приведена в Таблице 1.

Таблица 1	
СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
Эстрон	1,0
17-альфа-эстрадиол	< 0,05
3,17-диглюкоконъюгат	< 0,2
Андростенедиол	< 0,0002
Эстриол	< 1,2
Эстрон-3-бета-D-глюкоронид	< 1,0
Эстрон-3-сульфат	< 0,2
Этинилэстрадиол	< 0,5
Норгестрел	< 0,1
Прогестерон	< 0,1
Тестостерон	< 0,1
Норэтиндрон	< 0,1
Кортикостерон	< 0,1
Даназол	< 0,1
Диэтилстилбестрол	< 0,1

3.2. Коэффициент вариации результатов определения эстрадиола в одном и том же образце сыворотки или плазмы крови человека с использованием набора «СтероидИФА-эстрадиол» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации эстрадиола в анализируемых образцах при разведении их калибровочной пробой №1, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» эстрадиола — проверка соответствия значения определяемой концентрации эстрадиола расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация эстрадиола в анализируемом образце не превышает 30 пмоль/л.

3.6. Диапазон ожидаемых значений. Содержание эстрадиола измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов, у 43 здоровых мужчин в возрасте 21-39 лет, 127 здоровых женщин в возрасте 19-39 лет в различных фазах менструального цикла, 22 женщин в возрасте 49-65 лет в постменопаузе. Концентрация эстрадиола в сыворотке крови женщин с нормальным менструальным циклом в фолликулиновой фазе составляет 46-607 пмоль/л, в фазе овуляции – 315-1828 пмоль/л, в лютеиновой фазе – 161-774 пмоль/л, в постменопаузе – 30-201 пмоль/л. Концентрация эстрадиола в сыворотке крови мужчин составляет 28-156 пмоль/л.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности мето-

да, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: в наборе «СтероидИФА-эстрадиол» значения концентраций калибровочных проб выражены в пмоль/л. Для пересчета концентраций эстрадиола в пг/мл необходимо значение концентрации в пмоль/л разделить на 3,67.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 405 нм;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–500 мл;

- стакан стеклянный подходящего объема;

- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые или пластиковые;

- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

- контейнер для дезинфекции;

- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт (соли гепарина). После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку. Возможность использования других антикоагулянтов для набора «СтероидИФА-эстрадиол» не установлена.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать гемолизированные или мутные образцы сыворотки и плазмы, а также образцы, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется алиquotировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 1,0 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 0,75 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 – для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 – № 2 – для измерения величины оптической плотности КП №1;
C1, C2 – № 3 – для измерения величины оптической плотности КП №2;
D1, D2 – № 4 – для измерения величины оптической плотности КП №3;
E1, E2 – № 5 – для измерения величины оптической плотности КП №4;
F1, F2 – № 6 – для измерения величины оптической плотности КП №5;
G1, G2 – № 7 – для измерения величины оптической плотности КП №6;
H1, H2 – № 8 – для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.3. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 50 мкл конъюгата Е.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.4., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в термостатируемом шейкере без встряхивания при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре $+18...25^{\circ}\text{C}$.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм. Если значение оптической плотности превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при 405 нм. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

А1, А2 – № 1 – для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
В1, В2 – № 2 – для измерения величины оптической плотности КП №1;
С1, С2 – № 3 – для измерения величины оптической плотности КП №2;
D1, D2 – № 4 – для измерения величины оптической плотности КП №3;
Е1, Е2 – № 5 – для измерения величины оптической плотности КП №4;
F1, F2 – № 6 – для измерения величины оптической плотности КП №5;
G1, G2 – № 7 – для измерения величины оптической плотности КП №6;
Н1, Н2 – № 8 – для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.3. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 50 мкл конъюгата Е.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.4., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в термостатируемом шейкере без встряхивания при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре $+18...25^{\circ}\text{C}$.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм. Если значение оптической плотности превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при 405 нм. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП при 450 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации эстрадиола в калибровочных пробах (пмоль/л) (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо пользоваться формулой 1 или 2.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

$$B/B_1 \times 100\%, \quad (1)$$

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то использовать формулу:

$$(B - B_T)/(B_1 - B_T) \times 100\%, \quad (2)$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_1 – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1,

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.

9.2. Определить содержание эстрадиола в пробах по калибровочному графику.

9.3. Для образцов со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора (B_1) принимать значение концентрации «ниже 30 пмоль/л».

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации эстрадиола, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».



Рисунок 2. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных
экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «СтероидИФА-эстрадиол» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации эстрадиола в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «СтероидИФА-эстрадиол» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.
«20» декабря 2010г.

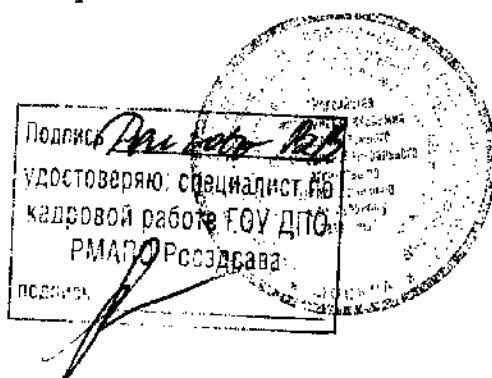


СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	100 мкл КП и КС	КТ +18 ...25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		100 мкл исследуемых образцов			
3		50 мкл конъюгата эстрадиол-пероксидаза			
4	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500-800об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор =14 мл буфера Р+266 мл Н ₂ О
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	+37°C	20'	В темноте, в термостатируе- мом шейкере, без встряхивания
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание		КТ	1 - 2'	шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после оста- новки ферментной реак- ции	Фотометр, 450 нм, 405 нм (см.п. 8.)
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бу- мага/ соответствующее ПО

Примечания: КП—калибровочная проба; КС—контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C); ПО — программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 16 (десяти) лист сб

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

М.В. Швырев