



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **ЭСТРАДИОЛА**
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
«СтероидИФА-эстрадиол»,
по ТУ 21.20.23-450-98539446-2018**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-эстрадиол» предназначен для количественного определения эстрадиола в сыворотке и плазме крови человека (с цитратом натрия, гепарином или ЭДТА) 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.

Повышение уровня эстрадиола в крови наблюдается при феминизации у детей, опухолях гонад и коры надпочечников, гинекомастии, циррозе печени, гипертиреозе.

1.3. Функциональное назначение набора «СтероидИФА-эстрадиол» - определение уровня эстрадиола в сыворотке и плазме крови человека. Количественное определение уровня эстрадиола в крови служит, как вспомогательное средство в диагностике, при оценке функционального состояния яичников, при выявлении причин нарушения менструального цикла, при бесплодии, недостаточности функции половых желез, при подозрении на эстрогенпродуцирующие опухоли.

1.4. Набор «СтероидИФА-эстрадиол» предназначен для однократного применения.

1.5. Набор «СтероидИФА-эстрадиол» предназначен только для диагностики *in vitro*, для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* в результате специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КДЛ, биолог, медицинский технолог)

1.6. Набор «СтероидИФА-эстрадиол» предназначен для обследования всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

1.7. Противопоказания к применению набора «СтероидИФА-эстрадиол» отсутствуют.

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).

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.

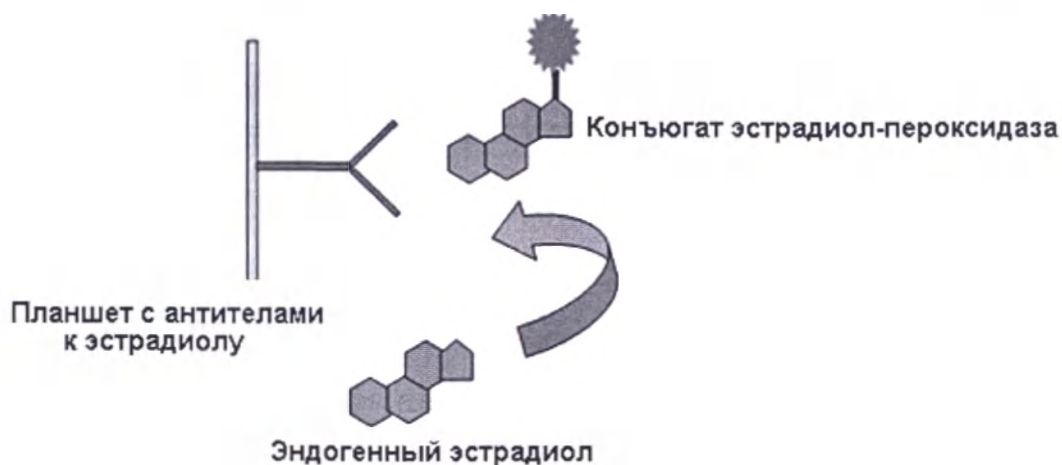


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав и комплектации набора

Набор «СтероидИФА-эстрадиол» выпускается в двух комплектациях:

Комплектация №1¹: на 96 определений при проведении анализа вручную в дубликатах 40 неизвестных проб или в монопликатах 88 неизвестных проб ² при использовании 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Комплектация №2: на 96 определений при проведении анализа на автоматическом анализаторе «Alisei Q.S.» SEAC/Next Level, Италия (далее «Alisei») в монопликатах 88 неизвестных проб, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы

¹ Допускается постановка анализа на автоматических анализаторах для ИФА открытого типа, за информацией о программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «СтероидИФА-эстрадиол» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: 8(812) 677-8779.

² При своевременной поверке измерительного оборудования (пипеток полуавтоматических и спектрофотометра вертикального сканирования), что позволяет свести к минимуму негативное влияние на результат неисправного оборудования).

для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Обратите внимание, при каждой постановке анализа обязательно нужно определять оптические плотности (ОП) калибровочных проб и ОП раствора ТМБ, а также концентрацию контрольной сыворотки (КС) в соответствии со схемой маркировки лунок (п.7.2.1.).

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

- комплект из двенадцати 8-луночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к эстрадиолу, маркирован «Стрипы с антителами к эстрадиолу» — 1 упаковка;

- калибровочные пробы (КП) на основе водно-солевого раствора, содержащие известные количества эстрадиола; точные значения концентраций эстрадиола (в диапазоне 0-2000 пг/мл) в КП указаны на этикетках флаконов и/или в паспорте набора реагентов – 6 или 8 флаконов* (по 0,5 мл и 1,0 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1). Калибровочные пробы аттестованы относительно РСР³ (Рабочий стандарт предприятия) в соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным пробам»;

- контрольная сыворотка на основе водно-солевого раствора, с известным содержанием эстрадиола,

³ РСР представляет собой набор образцов, содержащих эстрадиол. РСР стандартизован спектрофотометрическим методом. Измерение концентрации эстрадиола в РСР проводят на однолучевом автоматизированном спектрофотометре при $\lambda_{\text{max}} 280 \text{ нм}$ ($\lg \epsilon 3.28$).

аттестована относительно РСП³ (Рабочий стандарт предприятия) в соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным пробам», маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 или 2 флакона* (по 0,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

*Примечание: дополнительные флаконы калибровочных проб №3, №4 и контрольной сыворотки предназначены для рекалибрации по референсной калибровочной кривой при постановке на анализаторе «Alisei». За более подробной информацией обращайтесь к инструкции к анализатору «Alisei».

- конъюгат эстрадиол-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 2 или 3 флакона (по 11 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р (20X)» — 2 флакона (по 14 мл) или 1 флакон (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- раствор тетраметилбензидина, содержащий тетраметилбензидин, перекись водорода и стабилизаторы, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 или 2 флакона (по 14 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- стоп-реагент, 3,59% раствор соляной кислоты, маркирован «Стоп-реагент» — 1 или 2 флакона (по 14 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- одноразовый наконечник – 16 шт. (для комплектации №1);
- одноразовая ванночка – 2 шт. (для комплектации №1);
- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена, либо в пакет из алюминиевой фольги) – 1 шт.

Таблица 1

Кат. номер	100-40	100-40А
Название компонента	Комплектация №1	Комплектация №2
Комплект стрипов в рамке	1 шт	1 шт
Калибровочная проба №1	1 фл - 1,0 мл	1 фл - 1,0 мл
Калибровочные пробы №2 - №6	5 фл по 0,5 мл	7 фл по 0,5 мл
Контрольная сыворотка	1 фл - 0,5 мл	2 фл по 0,5 мл
Конъюгат Е	2 фл по 11 мл	3 фл по 11 мл
Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (Буфер Р (20X))	2 фл по 14 мл	1 фл-50 мл
Раствор ТМБ	1 фл - 14 мл	2 фл по 14 мл
Стоп-реагент	1 фл - 14 мл	2 фл по 14 мл
Одноразовый наконечник	16 шт	-
Одноразовая ванночка	2 шт	-
Пакет закрывающийся полиэтиленовый	1 шт	1 шт

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая специфичность. Определяется как способность теста обнаруживать только эстрадиол в присутствии интерферирующих и перекрестно-реагирующих факторов в исследуемом материале. В результате испытаний, проведенных на аликвотах образцов сыворотки и плазмы крови с внесенными кросс-реагентами установлено, что перекрестная реакция антител к эстрадиолу с другими стероидами составляет:

Таблица 2

Стероид	Перекрестная реакция, %
17 β -эстрадиол	100
Эстрон	2,0
Эстриол	0,39
Тестостерон	0,02
Кортизол	$< 7 \times 10^{-3}$
Прогестерон	$< 3 \times 10^{-4}$
ДГЭА-с	$< 1 \times 10^{-4}$

Повышение концентрации гемоглобина (до 5 мг/мл), билирубина (до 100 мкг/мл), сывороточного альбумина (до 50мг/мл) или триглицеридов (до 15 мг/мл) в некоторых пробах не оказывает негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «СтероидИФА-эстрадиол», но не следует использовать гемолизированные или мутные образцы.

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

3.3. Линейность.**Зависимость****концентрации**

эстрадиола в образцах сыворотки и плазмы крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2-№6 и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Определяется в тесте на «открытие» — проверке соответствия значения определяемой концентрации эстрадиола расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия в наборе «СтероидИФА-эстрадиол» составляет 90–110%.

3.5. Аналитическая чувствительность. Минимально достоверно определяемая набором концентрация эстрадиола в образцах не превышает 8,6 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Содержание эстрадиола измеряли в 196 образцах сыворотки и плазмы крови, взятой с 9 до 11 часов у здоровых лиц разного пола и возраста.

Диапазон ожидаемых значений у здоровых лиц представлен в Таблице 3.

Таблица 3

Женщины	18-45 лет	фолликулиновая фаза		30 – 100 пг/мл
		лютеиновая фаза		50 – 180пг/мл
		овуляторная фаза		130 – 350 пг/мл
	> 45лет	менопауза		< 60 пг/мл
Дети	0-9 лет	мальчики		< 15 пг/мл
		девочки		15-20,3 пг/мл
	9-14лет	мальчики		30,8-38,7 пг/мл
		девочки		162-230 пг/мл
	14-18 лет	юноши		29,8-33,1 пг/мл
		девушки	фолликулиновая фаза	30 – 100 пг/мл
			лютеиновая фаза	50 – 180 пг/мл
			овуляторная фаза	130 – 350 пг/мл
Мужчины18-45 лет				< 60 пг/мл

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, 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 пг/мл. Для пересчета концентраций эстрадиола в пмоль/л необходимо значение концентрации в пг/мл умножить на 3,67; для пересчета концентраций

эстрадиола в нмоль/л необходимо значение концентрации в пг/мл умножить на 272.

3.7. Ограничение теста. Пробы пациентов, принимающих накануне сдачи крови лекарственные средства, употребляющих соленую, жирную и острую пищу, употребляющих алкоголь, подверженных стрессам и физическому перенапряжению, для анализа с помощью набора «СтероидИФА-эстрадиол» использовать не рекомендуется.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

4.4. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

4.5. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

4.6. Стоп-реагент представляет собой 3,59% 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.

4.7. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ, 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.

4.8. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно. Поскольку ИФА чувствителен к ионам металлов, контакт металлических предметов с компонентами набора недопустим.

4.9. Для обработки посуды и оборудования рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, изготовленные на основе третичных аминов, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) или спиртов и разрешенные к применению на территории РФ. Использование дезинфицирующих средств на основе активного кислорода и хлора возможно лишь на предстерилизационном этапе, с последующей термической стерилизацией.

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

4.11. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.12. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.13. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.14. После использования стрипы, контрольные или калибровочные пробы, образцы и все расходные материалы, которые контактировали с образцами во время обработки, хранения или анализа (флаконы, перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и стерилизоваться в автоклаве с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.15. Во время процедуры ручной промывки планшета содержимое лунок необходимо выбрасывать в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов.

4.16. Не использовать набор по истечении срока годности.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 620-630 нм⁴;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C⁴;
- автоматическое промывочное устройство (вошер) для иммунологических планшетов^{4,5};
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми наконечниками⁶ с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 20–200 мкл; на 100–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными одноразовыми наконечниками⁶, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная или очищенная деионизованная⁷;

⁴ Допускается использование автоматических анализаторов для ИФА открытого типа с аналогичными характеристиками, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «СтероидИФА-эстрадиол» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: (812) 677-8779

⁵ При использовании автоматического промывочного устройства необходимо тщательно следить за его состоянием, периодически проверять емкости и соединительные шланги для промывочных буферов на наличие микробиологической обсемененности и других загрязнений, проводить техническое обслуживание в соответствии с рекомендациями производителя оборудования.

⁶ Повторное использование наконечников не допускается. При внесении каждого образца необходимо использовать новый наконечник

⁷ В соответствии с ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия» необходимо периодически контролировать качество воды, используемой для приготовления растворов

- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- дезинфицирующий раствор на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Дополнительно для проведения анализа в термостате:

- термостат, поддерживающий температуру $+37^{\circ}\text{C}^4$.

Дополнительно для проведения анализа на анализаторе «Alisei»:

- автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei»⁴;
- многоцелевые полипропиленовые пробирки 12x75 вместимостью 5 мл⁸;
- концентрированный водный раствор Триала, 5000-кратный концентрат, маркирован «Триал»⁸.

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 (цитрат натрия, гепарин или ЭДТА). После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку. Эквивалентность образцов сыворотки и плазмы крови человека, содержащей антикоагулянты (цитрат натрия, гепарин или ЭДТА), подтверждена на 50 образцах с

⁸ Компоненты, не входящие в состав набора, поставляются по отдельному заказу

разными количествами эстрадиола каждого вида антикоагулянта в анализе с помощью набора «СтероидИФА-эстрадиол», согласно ГОСТ 51352-2013

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку или плазму, а также образцы сыворотки или плазмы, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки или плазмы крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 3 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

6.4. Разведение исследуемых образцов сыворотки или плазмы крови. Если по предварительным данным или по результатам анализа (см.п.9.4.) значения концентрации эстрадиола выше КП №6, образцы следует развести КП №1.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

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

7.1.2. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р (20Х) развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 20 раз.

Например: 14 мл буфера Р (20Х) + 266 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию.

7.1.7. Рабочий раствор Триала. Необходимое количество концентрированного раствора Триала развести в 5000 раз дистиллированной или очищенной водой.

Например: 1 мл Триала + 4999 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до КТ.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Ручная постановка

На странице 28 приведена схема проведения анализа при ручной постановке.

7.2.1.1. 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;

Д1, Д2–№ 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;

H1, H2–№ 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.1.2. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки - по 25 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: в наборе «СтероидИФА-эстрадиол» общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 10 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.1.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 200 мкл конъюгата .

7.2.1.4. .Инкубировать стрипы. Возможно 2 варианта инкубации:

- в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37 С со скоростью 500–800 об/мин.

- в течение 120 минут без шейкирования в термостате при +37°С

(предварительно встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре).

7.2.1.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе

третичных аминов, ЧАС или спиртов и промыть лунки 3 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. В этом случае увеличить количество циклов промывки до 5 раз.

7.2.1.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать стрипы в течение 30 минут в темноте без шейкирования при КТ.

7.2.1.7. 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, встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20–30 секунд или на шейкере в течение 1–2 минут при КТ.

7.2.1.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.7.2.1.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при КТ.

7.2.2. Постановка на анализаторе «Alisei»

Анализатор «Alisei» имеет полностью

автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа определения концентрации эстрадиола с помощью набора «СтероидИФА-эстрадиол» введена в память анализатора.

7.2.2.1. В случае **дробного** применения набора необходимо извлечь калибровочные пробы и контрольную сыворотку из автоматического анализатора после их внесения в лунки планшета и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование калибровочных проб и контрольной сыворотки, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

7.2.2.2. Для каждой новой серии набора реагентов необходимо построение нового калибровочного графика с концентрациями калибровочных проб, указанными на этикетках флаконов и/или в паспорте набора реагентов.

7.2.2.3. Не допускается рекалибрация по калибровочной кривой, полученной на наборе другой серии.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. После выполнения постановки измерить на фотометре вертикального сканирования ОП в лунках при

длине волны 450 нм, рекомендуется использование референсного фильтра 620-630 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать ОП, полученную на референсном фильтре, из ОП, полученной при 450 нм, для каждой лунки.

При регистрации результатов необходимо вычитать среднюю величину ОП ТМБ, полученной в лунках А1 и А2, из значений ОП всех остальных лунок.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей (ОП, ед. опт. плотн.) от концентрации эстрадиола (пг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графиков зависит от способа преобразования осей.

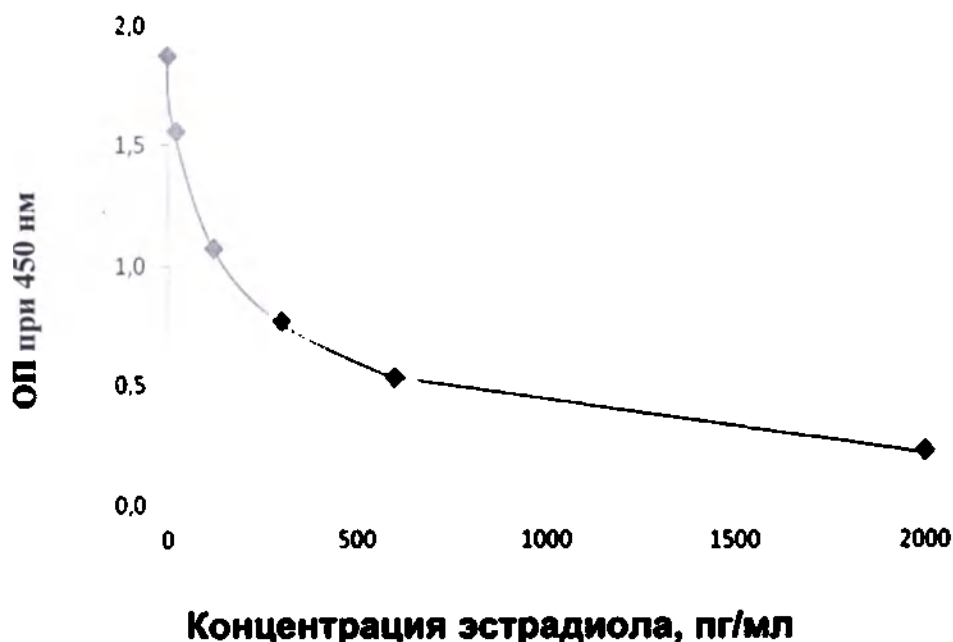


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

Примечания: Для построения калибровочного графика рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер», выбирая для аппроксимации зависимости функцию $4pL$.

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 8,6 пг/мл».

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации эстрадиола, превышающих номинал КП №6 не допускается. Для точного определения концентрации эстрадиола в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п.6.4.

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, в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

Срок годности набора – 18 месяцев.

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

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

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пакет закрывающийся полиэтиленовый и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более шести месяцев;

- стоп-реагент, концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок и раствор Триала после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- водно-солевой раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5-ти суток или при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более четырех недель.

- рабочий раствор Триала, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток.

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

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации эстрадиола в контрольной сыворотке;

- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента 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, входящих в состав данного набора реагентов. Запрещается смешивать растворы ТМБ с различными буквенными обозначениями в сериях.

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

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

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

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

10.10. Таблица расхода реагентов (при постановке ИФА вручную).

Количе-	Конъю-	Промывочный раствор	Рас-	Стоп-
---------	--------	---------------------	------	-------

ство используе мых стрипов	гат Е, мл	Буфер Р (20Х), мл	Дистиллирован-ная или очищенная деионизован- ная, мл вода, мл	твор ТМБ, мл	реа- гент, мл
3	5,5	7	133	3,5	3,5
4	7,5	10	190	4,7	4,7
5	9,0	12	228	5,8	5,8
6	11,0	14	266	7,0	7,0
7	13,0	17	323	8,2	8,2
8	15,0	19	361	9,3	9,3
9	16,5	21	399	10,5	10,5
10	18,5	24	456	11,7	11,7
11	20,0	26	494	12,8	12,8
12	22,0	28	532	14,0	14,0

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта, в емкостях или при помощи холодильных установок, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре +2...8 С. Допускается транспортирование набора при температуре до +25°С не более 15 суток, в том числе при температуре +37°С не более 1 суток.

11.2. Набор, транспортированный с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

12.1. При утилизации наборы с истекшим сроком годности должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

12.2. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «СтероидИФА-эстрадиол» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, лит. А, тел/факс: 8(812)677-8779

Бесплатная горячая линия 8-800-234-37-79 .

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

	Только для <i>in vitro</i> диагностики		Количество тестов
	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Номер серии		Срок годности
	Производитель		Хранить при
	Дата изготовления		Биологический риск
	Ознакомьтесь с инструкцией		Беречь от влаги

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-450-98539446-2018.

Примечания к Схеме проведения анализа (стр. 26):

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C);

ПО — программное обеспечение

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (только для ручной постановки)

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	25 мкл КП и КС	КТ +18 ...25 °С	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 10'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		25 мкл исследуемых образцов			
3		200 мкл конъюгата			
4	Инкубация	—	+37 °С	60'	Термостатируемый шейкер, 500-800 об/мин
				120'	Перед инкубацией перемешать. Термостат, без шейкирования
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (3 раза при ручной промывке или 5 раз при автоматической промывке)			1*промывочный раствор =14 мл буфера Р (20X) +266 мл H ₂ O
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	30'	В темноте, без шейкирования
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание		КТ	20-30"	Постукивание рамки
			КТ	1 - 2'	Шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм, 620-630 нм
11	Обработка результатов				Соответствующее ПО

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 28 (двадцать восемь) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»



Д.Г. Полынцев