



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСТРАДИОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-ЭСТРАДИОЛ

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
09.03.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-ЭСТРАДИОЛ предназначен для количественного определения эстрадиола в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Количественное определение уровня эстрадиола в крови имеет диагностическое значение при оценке функции репродуктивной системы.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- иммуносорбент – 96-луночный стриповый планшет с иммобилизованными антителами к эстрадиолу, 1 планшет;
- калибровочные пробы в диапазоне концентраций эстрадиола (0; 0,1-20) нмоль/л (точные значения концентраций эстрадиола указываются на этикетках микропробирок), жидкие препараты, 6 микропробирок по 0,5 мл. Калибровочные пробы эстрадиола откалиброваны относительно контрольных сывороток "BIO-RAD", (США, кат.№ 371, 372, 373);
- контрольная сыворотка (КС), жидкий препарат, 1 микропробирка; 0,5 мл;
- конъюгат – эстрадиол, меченный пероксидазой из корней хрена, жидкий препарат, 1 флакон; 22 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), жидкий препарат, 1 флакон, 13 мл;
- раствор ТМБ, жидкий препарат, 1 флакон; 1,0 мл;
- концентрат раствора для промывания планшета (КРП), жидкий препарат, 1 флакон, 20 мл;
- стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, 13 мл.

Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор ТМБ могут поставляться в одном флаконе.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, одной контрольной и шести калибровочных проб - всего 96 определений.

Количество реагентов рассчитано на три постановки по четыре стрипа.

2.3 Принцип работы набора состоит в следующем: в лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным эстрадиолом сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами эстрадиола и конъюгата.

Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна количеству эстрадиола в образце сыворотки крови. На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация эстрадиола в определяемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.2 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены правильно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 4.1 Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
 - микропланшетный шейкер;
 - суховоздушный термостат на 37 °С;
 - вихревой смеситель;
 - пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 до 5,0 мл;
 - пипетки 8-ми канальные автоматические типа со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл;
 - стаканы лабораторные стеклянные вместимостью 200-1000 мл;
 - флаконы вместимостью 10 и 20 мл;
 - ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри;
 - клейкая лента или крышка;
 - вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Подготовка стрипов

Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете без доступа влаги при температуре (2-8) °С в течение трех месяцев.

5.3 Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию. Перед работой микропробирки с калибровочными пробами и КС интенсивно встряхнуть, и избегая образования пены.

5.4 Приготовление раствора для промывания планшета

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть и отобрать в мерный стакан необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), довести дистиллированной водой до нужного объема и перемешать. Подготовленный к работе раствор для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 3 суток.

5.5 Приготовление хромоген-субстратного раствора

Приготовление хромоген-субстратного раствора требуется только в том случае, если раствор ТМБ и СБР поставляются в виде отдельных компонентов.

В чистый флакон с пробкой отобрать определенный объем СБР, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), и необходимый объем раствора ТМБ. Смесь тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием хромоген-субстратный раствор должен быть бесцветным.

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Хромоген-субстратный раствор	
	КРП, мл	Дистиллированная вода, до мл	Раствор ТМБ, мл	СБР, мл
4	5	200	0,2	4
8	10	400	0,4	8
12	20	800	0,6	12

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах маркировать следующим образом: №1 - В₀, №2 - В₁, №3 - В₂, №4 - В₃, №5 - В₄, №6 - В₅, №7 - В_{КС}, В_Х - исследуемые образцы.

6.2 Отобрать из каждой микропробирки с калибровочными пробами, КС и исследуемыми образцами по 0,02 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.3 Во все промаркированные лунки внести по 0,2 мл раствора конъюгата. Перемешать содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола.

6.4 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при постоянном встряхивании в течение 2 ч при температуре (18-25) °С.

6.5 Удалить содержимое лунок, тщательно стряхнув планшет над раковиной. Все лунки промыть 4 раза раствором для промывания планшета, приготовленным по п. 5.4 (по 0,3 мл в каждую лунку) и удалить остатки влаги.

6.6 Во все лунки внести по 0,1 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 5.5.

6.7 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С 15 мин.

6.8 Остановить реакцию добавлением во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента.

6.9 Встряхнуть планшет и измерить на спектрофотометре ОП раствора во всех лунках при длине волны 450 нм в течение 15 мин после остановки реакции.

7 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП (В), в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыровотку – КС, исследуемые образцы сыворотки крови – X_i.

7.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах откладывая по оси ординат значения ОП (в ОЕ), а по оси абсцисс - значения концентраций эстрадиола (нмоль/л) в соответствующих калибровочных пробах.

7.3 Определить по калибровочному графику содержание эстрадиола в КС. Содержание эстрадиола в КС должно соответствовать указанному значению на этикетке.

7.4 По калибровочному графику определить содержание эстрадиола в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность.

Перекрестная реакция антител к эстрадиолу с другими стероидами приведена в таблице 2.

Таблица 2

Стероид	Перекрестная реакция, %	Стероид	Перекрестная реакция, %
Эстрадиол	100	Прогестерон	0,001
Эстрон	8,0	17-альфа-окси прогестерон	0,005
Эстриол	1,0	Прегненолон	0,005
2-оксипрогестерон	0,01	Тестостерон	0,001
Кортизол	0,001	Дигидроэпиандростерон	0,005
Кортизон	0,001	Дезоксикортикостерон	0,002
Кортикостерон	0,001		

8.2 Чувствительность

Минимальная концентрация эстрадиола, достоверно определяемая с помощью набора, составляет не более 0,05 нмоль/л.

8.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации эстрадиола в образцах сыворотки крови с использованием набора не превышает 10%.

8.4 Тест на "открытие"

Процент "открытия" эстрадиола, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией эстрадиола, составляет (80-120)%.

8.5 Клиническая проверка набора

Концентрация эстрадиола в сыворотке крови здоровых доноров составляет: мужчины - (0,07-0,2) нмоль/л; женщины, фолликулярная фаза – менее 0,5 нмоль/л, лютеиновая фаза – (0,2-0,8) нмоль/л, беременность (3-й триместр) – (30-100) нмоль/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций эстрадиола, соответствующие нормальным значениям.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Набор реагентов должен храниться в сухом помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

После вскрытия флаконов с конъюгатом, КРП, СБР, раствором ТМБ и стоп-реагентом растворы можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

После вскрытия микропробирок с калибровочными пробами и КС растворы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца; при температуре не менее минус 20 °С - в течение всего срока годности набора. Допускается однократное замораживание и размораживание растворов.

9.2 Не допускается смешивание компонентов наборов разных серий.

Во время проведения анализа следует избегать подсыхания лунок на всех этапах постановки анализа и попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

9.3 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8) °С не более 72 ч после взятия пробы. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20 °С) не более одного раза. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания и содержащие азид натрия не пригодны для анализа.

9.4 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

9.5 Срок годности набора 6 месяцев с даты изготовления.

Приложение А (Информационное) Библиография

- [1] Приказ МЗ РБ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ МЗ РБ №351 от 16.12.98г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД ОСТ 42-21-2-85
- [3] Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы