

ЗМІСТ

1.	ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2.	ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
3.	АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4.	СКЛАД НАБОРУ	4
5.	ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6.	ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7.	ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8.	УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9.	ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10.	ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11.	ЛІТЕРАТУРА	9

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ 17-ОН-ПРОГЕСТЕРОНУ У СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «17-ОН-Прогестерон-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «17-ОН-Прогестерон-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації 17-ОН-Прогестерону у сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. 17-ОН-прогестерон (17-ОН-Р) – проміжний продукт у біосинтезі глюкокортикоїдів, естрогенів і андрогенів з молекулярною масою 330 Да. 17-ОН-Р секретується корою наднирників, яєчниками і насінниками за допомогою синтезу із прогестерону за допомогою ферменту 21-гідроксилази. 17-ОН-Р виробляється яєчниками під час фолікулярної фази в невеликій кількості, після чого його концентрація трохи збільшується і залишається незмінною до кінця лютеїнової фази. Рівень 17-ОН-Р зменшується, якщо запліднення не відбулося. У разі імплантації жовте тіло продовжує секретувати 17-ОН-Р. У клініці аналіз 17-ОН-Р важливий для діагностики вродженої гіперплазії наднирників, яка призводить до активації синтезу андрогенів і призводить до розвитку адреногенітального синдрому (АГС). При АГС основний шлях метаболізму стероїдів блокується через дефіцит 21-гідроксилази, в результаті чого концентрація 17-ОН-Р зростає в 5 і більше разів. У зрілому віці при частковому дефіциті ферменту або якщо він пізно з'явився, концентрація 17-ОН-Р може бути в нормі або підвищеною.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення 17-ОН-Прогестерону ґрунтується на використанні конкурентного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані кролячі поліклональні антитіла проти 17-ОН-Прогестерону. 17-ОН-Прогестерон зі зразку конкурує з кон'югованим 17-ОН-Прогестероном за зв'язування із антитілами на поверхні твердої фази. В результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина у лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації 17-ОН-Прогестерону в досліджуваному зразку. Концентрацію 17-ОН-Прогестерону в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту 17-ОН-Прогестерону в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція кролячих поліклональних антитіл проти 17-ОН-Р з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
17-ОН-Р	100%
11-Дезоксикортизол	2.3%
Прогестерон	<1.0%
Інші споріднені стероїди	<0.1%

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту 17-ОН-Прогестерону у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «17-ОН-Прогестерон-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації 17-ОН-Прогестерону у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить 17-ОН-Прогестерону, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 0,5-100 нмоль/л і складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації 17-ОН-Прогестерону підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 1,5 нмоль/л. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «17-ОН-Прогестерон-ІФА» концентрація 17-ОН-Прогестерону у сироватці (плазмі) крові не перевищує 0,12 нмоль/л.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-ть	Од.	Опис
1	P217Z	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт.	-
2	C217Z	CAL 1–6	Калібрувальні проби на основі сироватки крові людини, що містять відомі кількості 17-ОН-Прогестерону – 0; 0,5; 1,5; 5; 20; 100 нмоль/л, готові до використання (по 0.8 мл кожна)	6	шт.	прозора рідина пурпурового кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q217Z	CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом 17-ОН-Прогестерону, готова до використання (по 0,8 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
4	T217Z	CONJ HRP	Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідина пурпурового кольору
5	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
6	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
8	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт.	-
9	K217I	-	Інструкція з використання Набору реагентів «17-ОН-Прогестерон-ІФА»	1	шт.	-
10	K217Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «17-ОН-Прогестерон-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. В разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «17-ОН-Прогестерон -ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторах 41 досліджуваного зразка, 6 калібрувальних проб та 1 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, слід зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;
- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, слід зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб.

Важливе зауваження: Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. В разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищені) результати.

8.6. Під час використанні Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного незалежного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або із аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторах та 14 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Внесіть у відповідні лунки у двох повторах по 50 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторах по 50 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
3	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
4	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 90 хвилин при температурі +37 °С .
5	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видаляти залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
6	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет в темряві при кімнатній температурі (+18...+25°С) протягом 10–20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
7	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту ; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
8	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за повітрям.
9	Побудуйте в лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – десятковий логарифм концентрації 17-ОН-Прогестерону в калібрувальних пробах (нмоль/л), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод. Прирівняйте концентрацію калібрувальної проби С1 до нескінченно малої величини, наприклад, 0.001 нмоль /л
10	Визначте за калібрувальним графіком вміст 17-ОН-Прогестерону в досліджуваних зразках.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка. значення концентрацій 17-ОН-Прогестерону в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0,12 нмоль/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (100 нмоль/л) належить приводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація 17-ОН-Прогестерону нижча за 0,12 нмоль/л» або «вища за 100 нмоль/л».

10.2. В Наборі «17-ОН-Прогестерон-ІФА» значення концентрацій калібрувальних проб виражені в нмоль/л. Для перерахунку концентрацій в нг/мл, отримане значення концентрації в нмоль/л слід домножити на 0,32.

$$1 \text{ нмоль/л} = 0,32 \text{ нг/мл}$$

Досліджувана група	Одиниці, нмоль/л		Одиниці дод., нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
новонароджені	0.7	2.3	0.23	0.75
діти	0.1	2.7	0.03	0.89
Чоловіки				
пубертат	0.2	5.3	0.07	1.74
постпубертат	0.9	6.0	0.30	1.97
Жінки				
пубертат	0.1	7.0	0.03	2.30
постпубертат	0.2	8.7	0.07	2.85
Вагітні:	2.0	12	0.66	3.93
Фази циклу:				
фолікулярна	0.2	2.4	0.07	0.79
лютеїнова	0.9	8.7	0.30	2.85
менопауза	0.12	7.0	0.04	2.30

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17- hydroxyprogesterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:42, 1971
2. Chrousos, G.P., D. L. Loriaux, D.L. Mann, et al: Late onset 21- hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease. Annals Intern. Med. 96:143, 1982.
3. Buster, J.E., R.J. Chang, D.L. Preston, et al: Interrelationships of circulating maternal steroids; progesterone, 16ahydroxyprogesterone, 17a-hydroxyprogesterone, 20a-dihydroprogesterone, gamma-5-pregnenolone, gamma-5-pregnenolone-sulfate, gamma-5-pregnenolone-sulfate and 17-hydroxy gamma-5-pregnenolone, J. Clin. Endocrinol. Metab. 48:133, 1979.
4. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. Recent Progress in Hormone Research, 37:105, 1981.
5. Pang S., J. Hotchkiss, A. Drash, et al: Micro filter paper method for 17ahydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45:1003, 1977.
6. Lobo, R.A., U. Goebelsmann: Adult manifestation of congenital adrenal hyperplasia due to incomplete 21-hydroxylase deficiency mimicking polycystic ovarian disease. Am. J. Obstet. Gynecol., 138:720, 1980.
7. Urban, M.D., P.A. Lee and C.J. Migeon: Adult high infertility in men with congenital adrenalized hyperplasia. N. Engl. J. Med. 299:1392, 1978.
8. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. Fertil. Steril. 41:575, 1984

З питань якості Набору «**17-ОН-Прогестерон-ІФА**»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

03179, м. Київ, а/с 49

вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: + 38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Єліна Володимирівна

