

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного определения
17 α - ОН - прогестерона в сыворотке или плазме крови человека
методом иммуноферментного анализа

«ИФА-17-ОН-ПГ»

Рекомендована Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА-17-ОН-ПГ предназначен для количественного определения 17 α -гидроксипрогестерона (17-ОН-ПГ) в сыворотке или плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

Количественное определение содержания 17-ОН-ПГ в крови человека используется в клинической практике для диагностики адреногенитального синдрома и для оценки функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение основано на одностадийном варианте твердофазного иммуноферментного анализа, при котором происходит конкуренция 17-ОН-ПГ в анализируемом образце с 17-ОН-ПГ, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат), за связывание с моноклональными антителами к 17-ОН-ПГ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляются во время отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс выявляется ферментативной реакцией при добавлении субстрата и хромогена (тетраметилбензидина). Интенсивность окраски продукта окисления хромогена обратно пропорциональна содержанию 17-ОН-ПГ в анализируемой пробе.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сорбированный мышинными моноклональными IgG-антителами к 17-ОН-ПГ - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества 17-ОН-ПГ: 0 нг/мл (1,0 мл); 0,2; 0,4; 1,6; 6,4; 19,2 нг/мл (по 0,8 мл); концентрации 17-ОН-ПГ в калибровочных пробах могут незначительно изменяться от указанных величин, точные значения указаны на этикетках пробирок; готовые для использования – 6 пробирок;
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием 17-ОН-ПГ, готовая для использования - 1 пробирка (0,6 мл);
- конъюгат 17-ОН-ПГ с пероксидазой, готовый для использования - 1 флакон (6,0 мл);
- отмывочный раствор: фосфатно-солевой буфер с 0,05% твин-20, рН 7,2-7,4, 20-кратный концентрат – 1 флакон (50,0 мл);
- раствор хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 11-кратный концентрат – 1 пробирка (1,5 мл);
- субстратный буфер, содержащий перекись водорода, рН 4,6-4,8 – 1 флакон (15,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (15,0 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

- 4.1. Специфичность. Неспецифические реакции с родственными соединениями составляют: для 17 α -ОН-прегненолона – 1,3%, прогестерона – 1,2%, кортизола – 0,02%, холестерина – 0,0008%.
- 4.2. Чувствительность. Минимальная концентрация 17-ОН-ПГ, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,05 нг/мл.
- 4.3. Воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации результатов определения концентрации 17-ОН-ПГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови не превышает 8%.
- 4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» 17-ОН-ПГ - соответствие измеренной концентрации 17-ОН-ПГ и предписанной концентрации в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,4 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.
- 4.5. Линейность. Зависимость концентрации 17-ОН-ПГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей 17-ОН-ПГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,2-19,2 нг/мл и составляет 90-110%.
- 4.6. Клиническая проверка. Содержание 17-ОН-ПГ измеряли в сыворотке (плазме) крови, взятой с 9 до 11 часов, у 25 здоровых мужчин в возрасте 20-42 лет, 115 здоровых женщин в возрасте 18-37 лет в различных фазах менструального цикла, 14 женщин в возрасте 44- 51 лет в менопаузе, 24 беременных женщин, 16 новорожденных и 12 здоровых детей в возрасте 1-12 лет. Средние концентрации 17-ОН-ПГ в сыворотке (плазме) крови указаны в нижеприведенной таблице:

Возрастная группа	Единицы СИ
Женщины:	
Фолликулиновая фаза	0,6-3,6 нмоль/л (0,2-1,2 нг/мл)
Лютеиновая фаза	3,1-9,4 нмоль/л (1,0-3,1 нг/мл)
Менопауза	0,6-3,9 нмоль/л (0,2-1,3 нг/мл)
Беременные:	
1 триместр	4,0-9,0 нмоль/л (1,3-3,0 нг/мл)
2 триместр	6,0-15,0 нмоль/л (2,0-5,0 нг/мл)
3 триместр	15,0-25,0 нмоль/л (5,0-8,3 нг/мл)
Мужчины	1,5-7,2 нмоль/л (0,5-2,4 нг/мл)
Новорожденные (1-2 дня)	30,0-100,0 нмоль/л (9,9-33,0 нг/мл)
Дети (1-12 лет)	0,2-3,7 нмоль/л (0,07-1,2 нг/мл)

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора реагентов 17-ОН-ПГ уточнить значения концентраций 17-ОН-ПГ, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 5.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2б.
- 5.2 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 5.3 Тетраметилбензидин (ТМБ), субстратный буфер и рабочий раствор ТМБ чувствительны к воздействию солнечного света; необходимо также исключить их контакт с окислителями и металлами.
- 5.4 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.).
- 5.5 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов и возбудители других инфекций.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру +37°C, или планшетный шейкер-термостат на температуру +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50 мкл – 100 мкл;
- промыватель для планшет;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка (плазма) крови человека.

До проведения анализа возможно хранение образцов сыворотки (плазмы) крови при температуре +(2 – 8)° С не более 2 дней или в замороженном состоянии при температуре - 20 ° С (и ниже) не более 3 месяцев. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- 8.1. Приготовление рабочего отмывочного раствора. Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего раствора – 1 месяц при температуре +2 - +8°C.
Для анализа четырех стрипов: 15 мл концентрата довести до 300 мл дистиллированной водой.
- 8.2. Приготовление рабочего раствора ТМБ. Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.
Для анализа четырех стрипов: 0,4 мл концентрата ТМБ смешать с 4 мл субстратного буфера.
- 8.3. Калибровочные пробы, контрольная сыворотка, конъюгат 17-ОН-ПГ-пероксидаза, стоп-реагент готовы к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

- 9.1 Выдержать компоненты набора и анализируемые образцы крови при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ не менее 30 минут. **Пакет с планшетом не открывать!** Встряхнуть все компоненты набора.
- 9.2 Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество образцов + 6 калибровочных проб + 1 контрольная сыворотка) $\times 2$. Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с осушителем должен оставаться внутри). Хранить при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев.
- 9.3 **Внести в соответствующие лунки (в дубликатах) по 50 мкл** каждой калибровочной пробы (начиная с минимальной концентрации), контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.
- 9.4 **Внести во все лунки по 50 мкл конъюгата.** Конъюгат вносить в лунки планшета в той же последовательности, что и калибровочные пробы, контрольную сыворотку и исследуемые образцы. Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых образцов и конъюгата не должно превышать 10 минут.
- 9.5 Заклеить планшет липкой лентой. **Перемешать** содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 15 - 20 секунд и **инкубировать в течение 60 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$** (рекомендуется использовать шейкер-термостат).
- 9.6 Содержимое лунок удалить и **промыть лунки планшета 5 раз** рабочим отмывочным раствором (см п. 8.1), внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
- 9.7 **Внести** во все лунки **по 100 мкл рабочего раствора ТМБ** в той же последовательности, что и конъюгат.
- 9.8 **Инкубировать планшет в темном месте** при комнатной температуре $(+18-25^{\circ}\text{C})$ в течение **12 минут**.
- 9.9 **Внести** во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ, **по 100 мкл стоп-реагента.** Перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 секунд и **немедленно провести измерение оптической плотности** на фотометре при длине волны **450 нм** (настройка «нуля» прибора (бланк) – по воздуху).

10. РАСЧЕТЫ

- 10.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось Y) от концентрации 17-ОН-ПГ в калибровочных пробах (ось X).
- 10.2. Рассчитать средние арифметические значения показателей оптической плотности контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови и по калибровочному графику определить концентрацию 17-ОН-ПГ.
- 10.3. При построении калибровочного графика и определении концентрации 17-ОН-ПГ в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора иммуноферментных реакций рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.
- 10.4. Для выражения концентрации 17-ОН-ПГ в нмоль/л значения, полученные в нг/мл, следует умножить на коэффициент 3,03.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

- 11.1. Набор реагентов ИФА-17-ОН-ПГ 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 3 суток.
- 11.2. Срок годности набора – 1 год.
- 11.3. В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:
- вскрытый планшет можно хранить в плотно закрытом пакете с осушителем при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев;
 - калибровочные пробы, контрольную сыворотку, конъюгат, раствор ТМБ и субстратный буфер после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 месяцев;
 - рабочий отмывочный раствор можно хранить в закрытой емкости при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
 - рабочий раствор ТМБ хранению не подлежит;
 - стоп-реагент можно хранить в закрытой емкости при комнатной температуре в течение всего срока годности.
- 11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме того, рекомендуется определение 17-ОН-ПГ в контрольной сыворотке.
- 11.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора ИФА-17-ОН-ПГ, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119828, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1а, телефон/факс: (495)246-45-01, или (e-mail) info@lytech.ru и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (495)120-60-95; 120-60-96.

Рекомендации для пользователей

1. Перед использованием набора необходимо внимательно изучить инструкцию по применению и строго соблюдать изложенные в ней требования. Производитель не несет ответственности за последствия, вызванные возможной некорректной работой набора в случае несоблюдения требований инструкции.
2. Для каждого реагента и каждого этапа реакции должны быть использованы новые наконечники для пипеток.
3. Используйте только те количества реагентов, которые необходимы для данной постановки реакции. Оставшиеся неиспользованными растворы категорически запрещается переливать обратно во флаконы с исходными реагентами.
4. В процессе постановки реакции необходимо предотвращать подсыхание лунок планшета и попадание на них яркого света и солнечных лучей.
5. Для получения качественных результатов необходимо аккуратное и полное удаление отмывочного раствора.
6. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации, необходимо все реагенты, особенно стоп-реагент, вносить в лунки в той же последовательности и с той же скоростью, что и предыдущие реагенты.
7. В процессе постановки реакции не касаться дна лунок.
8. ТМБ и рабочий раствор субстрата, а также стоп-реагент могут вызывать раздражение кожи и слизистых покровов при попадании на них. В этом случае необходимо обильно промыть водой место контакта и обратиться за медицинской помощью.

Краткая схема проведения анализа
Необходимое количество лунок: (количество образцов + 7) x 2
Внести:

Стандарты S₀ – S₅, образцы, контрольная сыворотка	50 мкл
Конъюгат	50 мкл

Перемешать

Инкубация 1 час при температуре 37°C

Отмывка 5 раз (300 мкл/ лунка) отмывочным раствором

Внести 100 мкл рабочего раствора субстрата

Инкубация 12 мин при комнатной температуре в темноте

Внести 100 мкл стоп-реагента

Измерение ОП при длине волны 450 нм

ВНИМАНИЕ! Прежде, чем пользоваться данной схемой,
внимательно ознакомьтесь с полной инструкцией к набору