

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
17-ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ
(СтероидИФА-17-ОН-прогестерон)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов СтероидИФА-17-ОН-прогестерон предназначен для количественного определения концентрации 17-ОН-прогестерона в сыворотке и плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. 17-ОН-прогестерон относится к стероидным гормонам. Он секретируется в коре надпочечников и половых железах. Измерение содержания 17-ОН-прогестерона в сыворотке и плазме крови может использоваться для мониторинга активности 21-гидроксилазы коры надпочечников. Дефицит 21-гидроксилазы чаще всего выявляется при врожденной гиперплазии коры надпочечников и приводит к избыточной секреции 17-ОН-прогестерона, уровень которого существенно повышается в периферической крови. При этом дефицит 11-гидроксилазы приводит лишь к умеренному повышению содержания 17-ОН-прогестерона. Таким образом, установление уровня этого стероидного гормона играет важную роль в дифференциальной диагностике врожденной гиперплазии коры надпочечников.

У небеременных женщин уровень 17-ОН-прогестерона в крови зависит от фазы менструального цикла. Как и прогестерон, 17-ОН-прогестерон секретируется зрелым фолликулом и желтым телом. Его концентрация выше после овуляции. Кроме того, уровень 17-ОН-прогестерона изменяется в течение дня и коррелирует с секрецией кортизола. Его максимальное содержание выявляется в образцах, полученных между полночью и восьмью часами утра. Имеются данные о подобных колебаниях уровня 17-ОН-прогестерона и у мужчин. Во время беременности гормон продуцируется в больших количествах плодом, плацентой и корой надпочечников.

1.3. Набор 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-17-ОН-прогестерон использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата 17-ОН-прогестерон-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным 17-ОН-прогестероном сыворотки или плазмы крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами 17-ОН-прогестерона и конъюгата 17-ОН-прогестерон-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству 17-ОН-прогестерона в анализируемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата 17-ОН-прогестерон-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация 17-ОН-прогестерона в определяемых образцах.

2.2. Состав набора

комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок поликлональными антителами к 17-ОН-прогестерону, маркирован «Стрипы с поликлональными антителами к 17-ОН-прогестерону» – 1 пакет;
калибровочные пробы (КП) на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества 17-ОН-прогестерона. Точные значения концентраций 17-ОН-прогестерона в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентируемые – 0; 1; 3; 10; 20; 60 нмоль/л – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл)

конъюгат 17-ОН-прогестерон-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (10 мл);
концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» – 1 флакон (14 мл);
раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
стоп-реагент (1Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием 17-ОН-прогестерона,
маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость по 0,5 мл);
прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 шт.;
пленка полиэтиленовая для заклеивания планшетов – 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к 17-ОН-прогестерону с другими стероидами приведена в таблице

Таблица

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
17 α -гидроксипрогестерон	100
Эстриол	< 0,01
Эстрадиол 17 β	< 0,01
Тестостерон	< 0,01
Дигидротестостерон	< 0,01
Деоксикортикостерон	0,05
11-Дезоксикортизол	1,4
Прогестерон	1,2
ДГЭА	< 0,01
ДГЭАС	< 0,001
Кортизол	< 0,01
Кортикостерон	< 0,05
Альдостерон	< 0,01
Андростендион	< 0,01

3.2. Коэффициент вариации результатов определения 17-ОН-прогестерона в одном и том же образце с использованием набора СтероидИФА-17-ОН-прогестерон не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации 17-ОН-прогестерона в анализируемых образцах при разведении их сывороткой крови, не содержащей 17-ОН-прогестерона, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1,0 – 60,0 нмоль/л и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» 17-ОН-прогестерона – соответствие измеренной концентрации 17-ОН-прогестерона предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация 17-ОН-прогестерона в анализируемом образце не превышает 0,3 нмоль/л.

3.6. В наборе СтероидИФА-17-ОН-прогестерон значения концентраций калибровочных проб выражены

в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл необходимо значение концентрации в нмоль/л умножить на 0,33.

3.7. Клиническая проверка. Содержание 17-ОН-прогестерона измеряли в сыворотке крови взятой с 9 до 11 часов у 60 здоровых лиц в возрасте 21-45 лет. Концентрация 17-ОН-прогестерона в сыворотке крови женщин с нормальным менструальным циклом в фолликулиновой фазе составляет <0,3–3,6 нмоль/л, в лютеиновой фазе – 2,1-7,3 нмоль/л. Концентрация 17-ОН-прогестерона в сыворотке крови мужчин составляет 2,0-6,5 нмоль/л.

3.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций 17-ОН-прогестерона, соответствующие нормальным.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Компоненты на основе крови человека, входящие в состав набора, проверены на ВИЧ и гемоконтактные гепатиты. Однако ни один из существующих методов проверки не дает абсолютной гарантии отсутствия возбудителя, поэтому эти компоненты являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

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

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 длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3–4 мм и частотой 8–13 Гц — (500–800 об/мин) при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндры мерные, позволяющие отмерять 50-500 мл;
- стаканы стеклянные вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 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. Для проведения анализа не разрешается использовать гемолизированную или мутную сыворотку или плазму, а также образцы сыворотки или плазмы, содержащие азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется 20°C или–аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

прогестерон-пероксидаза, мкл									
Инкубация № 1	30 минут, термостатируемый шейкер, +37°C								
4-х кратная промывка: промывочный буфер, мкл	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 20 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	КТ, шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага, либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания:

КП – калибровочная проба;
КС – контрольная сыворотка;
СХ – анализируемые пробы;
ОП – оптическая плотность;
КТ – комнатная температура (+18...25°C).

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

7.9. Во все лунки, кроме А1 и А2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата 17-ОН-прогестерон-пероксидаза.

7.10. Накрыть стрипы пленкой для заклеивания, входящей в состав набора, и инкубировать в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500-800 об/мин.

7.11. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.3, 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.

7.12. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15 — 30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.13. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

7.14. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.13, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более 20 минут при температуре С.°+2...8

8.РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

8.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу $V/V_1 \times 100\%$ для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, V_1 – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $(V-V_t) / (V_1-V_t) \times 100\%$, где V_t – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

9.УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. В координатах «logit-log» построить для калибровочных проб график зависимости $V/V_1 \times 100\%$ от концентрации 17-ОН-прогестерона в калибровочных пробах (нмоль/л).

9.2. Определить содержание 17-ОН-прогестерона в пробах по калибровочному графику.

9.3. Для сывороток со значениями оптической плотности ниже оптической плотности нулевого калибратора (V_1) принимать значение концентрации меньше 0,3 нмоль/л.

10.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор СтероидИФА-17-ОН-прогестерон 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.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:
стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности;
восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^\circ\text{C}$ не более 1 месяца;
жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов 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;
буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (С) не более 5 суток; $+18...25^\circ\text{C}$
буфер Р С в течение и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2..8$ всего срока годности.

10.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку или плазму крови, а также образец, содержащий азид натрия.

10.3. Пробы анализируемого образца можно хранить С не более 2 дней; при необходимости более длительного при температуре $+2..8$ хранения (до С³ месяцев) – при температуре -20 и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий 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 17-ОН-прогестерона в контрольной сыворотке.

10.5. Запрещается смешивать разные серии специфических реагентов тест-системы, смешивать с реагентами других производителей и использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора СтероидИФА-17-ОН-прогестерон следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80.

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био» М.В. Швырев

Зав. лабораторией

Разработки ИФА-систем А.С. Сусорова

Главный врач СПб ГУЗ

«Консультативно-диагностический центр № 85» С.Н. Рулев