



Набір ІФА для кількісного визначення 17- α -ОН-ПРОГЕСТЕРОНУ

Кат. № : EIA-1292
Кількість аналізів : 96
Виробник : DRG (Німеччина)

Методика від 05-2012
Версія 10.0

Увага: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції англ. мовою.

1. ВСТУП

Імуноферментний набір компанії DRG містить матеріали для кількісного визначення 17- α -ОН-прогестерону в сироватці. Аналіз призначений тільки для застосування в діагностиці *in vitro*.

1.2 Короткий опис і пояснення

Стероїд 17- α -ОН-Прогестерон (17- α -ОНП) секретується як наднирниками, так і гонадами. Хоч він і має незначну прогестеронову активність, клінічне значення його надзвичайно велике, оскільки він є безпосереднім попередником 11-дезоксикортизолу. Так як 11-дезоксикортизол синтезується через 21-гідроксилювання 17- α -ОНП, визначення 17- α -ОНП є непрямом ознакою активності 21-гідроксилази. При спадковій недостатності 21-гідроксилази формується в зв'язку з надлишком синтезу 17- α -ОНП вроджена адренальна гіперплазія. Також він помірно підвищений при недостатності 11- β -гідроксилази. Вимірювання 17- α -ОНП, таким чином, є цінним методом діагностування вродженої адренальної гіперплазії.

1.3 Клінічна фізіологія

Дорослі невагітні жінки

У дорослих невагітних жінок дитородного віку концентрація 17- α -ОНП протягом менструального циклу, зростаючи у лютеальну та знижуючись у фолікулярну фази. Це зв'язано з тим, що 17- α -ОНП секретується паралельно з прогестероном дозрілими фолікулами або жовтим тілом. Існує також добова циркадна варіабельність концентрації 17- α -ОНП. Його секреція здійснюється паралельно з кортизолом і сягає максимуму між північчю і 8.00 ранку.

Дорослі чоловіки

Поки що є мало інформації щодо варіабельності концентрації 17- α -ОНП у дорослих чоловіків.

Вагітні жінки та новонароджені

Стероїд 17- α -ОНП продукується у великій кількості плодом і наднирниковими залозами. Він секретується як в кровообіг плода, так і матері. Концентрація 17- α -ОНП в крові матері зростає різко після 32 тижня гестації і сягає в цей період в 4 рази більше базального рівня.

1.4 КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Вроджена адренальна гіперплазія

Визначення 17- α -ОНП застосовується в діагностиці вродженої адренальної гіперплазії у новонароджених з невизначеними геніталіями і у дівчаток з вірильністю. Оскільки 17- α -ОНП є попередником 11-дезоксикортизолу, базальна концентрація 17- α -ОНП значно підвищена у пацієнтів з недостатністю 21-гідроксилази і в меншій мірі - з недостатністю 11- β -гідроксилази. Так як 17- α -ОНП значно зростає у новонароджених та дівчаток з вродженою наднирковою недостатністю, для постановки діагнозу часто буває достатнім одне вимірювання 17- α -ОНП.

Пізній початок адренальної гіперплазії

Також, вимірювання концентрації 17- α -ОНП проводиться у андрогенізованих жінок, коли підозрюється пізній початок функціонування 21-гідроксилази. Цей стан клінічно дуже важкий для діагностики і так як картина така сама, як при класичному полікістозі яйників, концентрації 17- α -ОНП на відміну від класичної вродженої адренальної гіперплазії, залишаються нормальними. Діагностування проводять шляхом проведення тесту стимуляції АКТГ.

Інше застосування

Вимірювання концентрації 17- α -ОНП застосовують у жінок та чоловіків при акне вульгаріс, облісінні чоловіків і деяких неясних формах безпліддя. Досвід щодо такого застосування дуже обмежений.

2. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір базується на принципі конкурентного зв'язування.

Невідома кількість 17- α -ОНП, присутня у зразку, і фіксована його кількість, кон'югована з пероксидазою хрому, конкурують за зв'язування з поліклональною анти-17- α -ОНП-сироваткою, що покриває дно лунок. Після інкубації планшетка промивається, щоб зупинити реакцію зв'язування. Після додавання субстрату визначається концентрація 17- α -ОНП, яка обернено пропорційна вимірюваній оптичній густині.

3. ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Тільки для діагностичного використання "in vitro".
- Для одержання інформації щодо шкідливої дії складових тесту звертайтеся до Material Safety Data Sheets.
- Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
- Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту зі шкірою і слизовими

оболонками.

- НЕ курити, не їсти і не використовувати косметику у місцях проведення аналізу.
- При роботі з реагентами і зразками використовуйте одноразові рукавички. Мікробіологічне забруднення реагентів і зразків може дати неправильні результати.
- Робота повинна проводитися згідно установлених правил щодо безпеки.
- Не використовувати тест після дати придатності, вказаної на упаковці.
- Всі об'єкти потрібно вносити згідно інструкції. Оптиміальні результати можна одержати тільки при використанні каліброваних піпеток і мікропланшетного рідера.
- Не змішуйте реагенти різних лотів наборів. Не змішуйте лунки планшета при проведенні аналізу. Тести могли перевозитися і зберігатися при різних умовах, а тому спільні ознаки і характеристики планшетів різних тестів можуть давати дещо різні результати.
- Хімічні складові і приготовлені або використовувані реагенти треба використовувати і вважати небезпечними, а при їхньому знищенні слід керуватися національними вказівками і регулюванням по безпеці.

4. КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

4.1 Реагенти, які постачаються

- Мікропланшетка з лунками:** 1шт., 96 лунок, покритих анти-17- α -ОНП-сироваткою.
- Набір стандартів (0-6): 7 флаконів;** 1,0 мл на флакон:
Концентрації: 0,15; 0,5; 1,5; 3; 7,5; 20 нг/мл
0; 0,45; 1,5; 4,5; 9,1; 22,7; 60,6 нмоль/л. Готові до використання.
- Ферментний кон'югат,** 1 фл., 25 мл. 17- α -ОНП, кон'югований з пероксидазою хрому. Готові до використання.
*містить Проклін 300 0,3 %, BND 0.015 % та MIT 0,010% в якості консервантів.
- Розчин Субстрату:** TMB, 1 фл., 25 мл.
- Стоп-розчин:** 0,5 М H₂SO₄, 1 фл., 14 мл. Уникайте контакту. Може визвати подразнення та опіки.
- Мийний розчин, 40 х,** 30 мл.
*BND = 5-бромо-5-нітро-1,3-діоксан
MIT = 2-метил-2Н-ізотіазол-3-один

Примітка: Додатково Стандарт 0 для розведення зразків наявний за вимогою.

4.2 Матеріали, що не постачаються

- Фотометр (450 нм \pm 10 нм).
- Мікропіпетки 100 і 200 мкл.
- Промокальний папір.
- Дистильована вода.
- Напів-логарифмічний графічний папір

4.3 Зберігання та стабільність набору

При зберіганні при температурі 2-8^oC активність реагентів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати. Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8^oC. Після відкриття ящика треба знову тісно його запечатати. Імунореактивність лунок стабільна приблизно 6 тижнів після відкриття, але наступного тісного запечатування з десікатором.

4.4 Приготування реагентів

Всі реагенти і необхідну кількість стрипів приведіть до кімнатної температури.

Промийний розчин

Додайте деіонізованої води 1170 мл до концентрованого Мийного розчину (вміст: 30 мл) до кінцевого об'єму 1200 мл. Розведений Мийний розчин стабільний при кімнатній температурі 2 тижнів.

5. ЗРАЗКИ

В аналізі можна використовувати сироватку.

Не використовувати гемолізовані, істеричні чи ліпемічні зразки.

Зауважте: зразки з азидом натрію не повинні використовуватись.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

- Збирайте кров, пунктуючи вену; дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не потрібно ніякої попередньої обробки зразків. Пацієнтам, котрі проходять антикоагуляційну терапію треба давати довший період для зсідання крові.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки можуть зберігатись при 2-8^oC 24 години. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20^oC чи нижче. Заморожені зразки слід декілька разів перевернути перед використанням.

5.3 Розбавлення зразків:

Зразки, у яких передбачається концентрація більша ніж у найвищому стандарті, повинні бути розведені Нульовим стандартом і провести аналіз ще раз згідно Процедури Аналізу.

Наприклад:

- розведення 1:10 – 10 мкл Виворотки + 90 мкл Нульового Стандарту (повністю перемішати)
- розведення 1:100 – 10 мкл розведення А) 1:10 + 90 мкл Нульового Стандарту (повністю перемішати)

6. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.

- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.

- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням. При піпетування Субстрату та Стоп-розчину уникайте піпеток з металевими частинами.
- Піпетуйте зразки і стандарти на дно лунок. При піпетування кон'югату і Стоп-розчину рекомендується тримати піпетку у вертикальному положенні над лункою і піпетувати відповідну кількість в центр лунки, щоб досягнути повного змішування.
- Інкубація – це функція інкубаційного часу і температури. Перед початком аналізу рекомендується приготувати всі реагенти і складові аналізу. Це зекономить час проведення аналізу без перерви.
- За загальним правилом ферментативна реакція лінійно пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Для кожного аналізу слід будувати стандартну криву.

- Відділіть необхідну кількість лунок;
- Додайте **25 мкл** Стандарту, Контролю і зразків у відповідні лунки чистими наконечниками;
- Інкубуйте **5 хвилин** при кімнатній температурі;
- Додайте **200 мкл** Ферментного кон'югату в кожну лунку;
- Добре змішайте планшетку протягом 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування розчинів в цьому етапі;
- Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі;
- Різно вилийте вміст лунок; Промийте лунки тричі розведеним Мийним розчином (400 мкл на лунку). Промокніть лунки на промокальному папері, щоб видалити залишки; Важливо правильно провести промивання.
- Додайте **200 мкл** Субстрату в кожну лунку за фіксовані часові інтервали;
- Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі;
- Зупиніть реакцію додаванням в кожну лунку **100 мкл** Стоп-розчину.
- Зчитайте дані на фотометрі при 450 ± 10 нм впродовж **10 хвилин** після додавання Стоп-розчину.

6.3 Вирахування результатів

- Вирахуйте середні значення оптичної густини для кожного набору стандартів, контролів і зразків пацієнта
- Побудуйте стандартну криву відкладаючи значення оптичної густини, одержані з кожного стандарту по вертикалі, навпроти їхньої концентрації по горизонталі.
- Використовуючи середнє значення оптичної густини для кожного зразка вичисліть відповідні концентрації з стандартної кривої.
- Автоматичний метод: Результати в IFU були автоматично вичислені використовуючи 4-х параметрову криву.
- Концентрацію зразка можна зчитати прямо із стандартної кривої. Зразки концентрацією більше ніж найвищий стандарт, треба розвести. Для обчислення концентрації, слід взяти до уваги фактор поділу.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані тільки для демонстрації і не можуть використовуватись при тестуванні.

Стандарт	Оптичні одиниці
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1,89
Стандарт 1 (0,15 нг/мл)	1,51
Стандарт 2 (0,5 нг/мл)	1,1
Стандарт 3 (1,5 нг/мл)	0,69
Стандарт 4 (3,0 нг/мл)	0,46
Стандарт 5 (7,5 нг/мл)	0,28
Стандарт 6 (20 нг/мл)	0,18

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується для кожної лабораторії встановити свої нормальні значення.

Новонароджені	Дівчатка (нг/мл)	Хлопчики (нг/мл)	Дівчатка та хлопчики (нг/мл)
1 міс. віку	2,4-16,8	0,0-8,0	0-16,8
2 міс. віку	1,6-9,7	3,6-13,7	1,9-9,8
3 міс. віку	0,1-3,1	1,7-4,0	0,1-4,0

Діти	3-14 років	0,07-1,7
Жінки репродуктивного віку (фази):	фолікулярна	0,1-0,8
	лютеальна	0,6-2,3
	овуляція	0,3-1,4
	після АКТГ	< 3,2
	3 триместр	2,0-12
Здорові чоловіки	постменопауза	0,13-0,51
		0,5-2,1

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно державних і федеральних правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Динамічний діапазон аналізу: 0,034 – 20 нг/мл

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність:

Стероїд	% перехресної реактивності
17- α -ОН Прогестерон	100,0
Естріол	менше 0,01
Естрадіол 17 β	менше 0,01
Тестостерон	менше 0,01
Дигідротестостерон	менше 0,01
DOC	0,05
11-Дезоксикортизол	1,4
Прогестерон	1,2
DHEA	менше 0,01
DHEAS	менше 0,001
Кортизол	менше 0,01
Кортикостерон	менше 0,05
Альдостерон	менше 0,01
Андростендіон	менше 0,01
Дигідроепіандростен-сульфат	менше 0,01
Преднізон	менше 0,01

9.3 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість була обчислена : середня мінус два стандартних відхилення з двадцяти (20) реплікацій цих аналізів Нульового Стандарту і становить 0,034 нг/мл.

9.4 Точність

9.4.1 Точність в межах аналізу

Зразок	n	Середнє нг/мл	КВ, %
1	20	0,5	5,4
2	20	2,8	6,4
3	20	7,2	5,5

9.4.2 Точність між аналізами

Зразок	n	Середнє нг/мл	КВ, %
1	12	0,5	7,2
2	12	3,0	6,2
3	12	7,8	6,9

9.5 Відтворюваність

Відтворюваність була вичислена шляхом додавання все більшого об'єму аналізу у три різні зразки виворотки пацієнта, котрі вміщують різні обсяги ендogenous аналізу. Кожний зразок був проаналізований і концентрації зразків були обчислені із стандартної кривої. Процентне відношення відтворення було вичислене при очікуваних і вимірних значеннях зразків.

Зразок	Ендог. 17- α -ОНП, нг/мл	Доданий 17- α -ОНП, нг/мл	Вимірний 17- α -ОНП, нг/мл	Очікуваний 17- α -ОНП, нг/мл	Відтворюваність, %
1	11,18	0,0	11,2		
		10,0	13,5	15,6	86,5
		3,75	9,8	9,3	105,3
		1,50	6,1	7,1	85,9
		0,75	5,4	6,3	85,0
2	1,43	0,00	1,4		
		10,00	9,7	10,7	90,2
		3,75	4,7	4,5	104,3
		1,50	2,5	2,2	111,9
		0,75	1,7	1,5	113,1
3	4,68	0,00	4,7		
		10,00	11,2	12,3	90,6
		3,75	6,0	6,1	99,1
		1,50	3,9	3,8	101,5
		0,75	3,5	3,1	112,8

9.6 Лінійність

Див. оригінал інструкції

10. ОБМЕЖЕННЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ

10.1 Взаємодіючі речовини

Будь-яке неправильне використання зразків чи зміна процедури тесту може дати неправильні результати. Гемоглобін (до 4 мг/мл), Білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 7,5 мг/мл) не впливають на результати тесту.

10.2 Взаємодія з ліками

НЕ має інформації щодо ліків, які можуть яким чином вплинути на визначення рівня Прогестерону 17- α -ОН.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

При проведенні тесту не спостерігалось «хук-ефекту».

ЗАКОНОДАВЧІ АСПЕКТИ

Див. оригінал інструкції.

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

ПМП «ДІАМЕБ»
вул. Черновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76014
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua