

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА

4825-300, Progesterone Test System

Каталог. № : 4825-300

Методика от 03-09-2012

Количество : 96

Версия 5

Производитель: Monobind (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Прогестерона в человеческой сыворотке или плазме.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Измерение прогестерона в сыворотке или плазме считается наиболее достоверным способом измерения скорости его продукции.

Прогестерон – это стероидный гормон, играющий важную роль в подготовке и поддержании беременности. Он синтезируется из холестерина через образование прегненолона, а затем быстро метаболизируется до прегнандиола, преимущественно в печени. Основными источниками продукции служат яичники и плацента; но небольшие количества также продуцируются корой надпочечника и у мужчин, и у женщин. Уровень циркулирующего прогестерона, характерно низкий во время фолликулярной фазы, монотонно повышается на протяжении лютеиновой фазы менструального цикла, достигает максимума приблизительно через 5 – 10 дней после пика ЛГ середины цикла. Если беременность не наступила, наблюдается резкое снижение до уровня фолликулярной фазы, приблизительно за 4 дня до наступления следующего менструального периода. Этот характер лежит в основе широко используемого измерения уровня прогестерона в сыворотке как простого и достоверного метода определения овуляции.

Для рутинных определений предпочтительно использовать иммунные методы, с использованием специфических антител к стероидам. В первых иммунных методах определения уровня прогестерона в сыворотке было необходимо с помощью растворителей отделять стероиды от эндогенных связывающих белков, таких как кортикостероид связывающий глобулин (СВГ) и альбумин. В настоящее время оптимальным для рутинных анализов считается прямое определение прогестерона в образцах сыворотки или плазмы. На рынке доступны различные методы, РИА, ИФА, ЛИА. Так как РИА предполагает использование и работу с радиоактивной меткой, а также необходимость утилизации радиоактивных отходов, то его заменяют на различные не радиоактивные методы. Эти методы основаны на использовании высокоспецифических антител для определения уровня циркулирующего прогестерона.

Данный метод Progesterone ELISA основан на использовании специфических антител к прогестерону, и не требует предварительной экстракции образцов сыворотки или плазмы. Перекрестная реактивность с другими естественными стероидами, присутствующими в кровотоке, и обладающими похожей структурой, низкая.

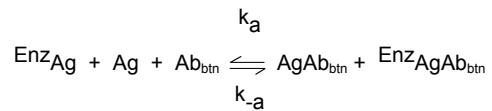
Использование нескольких сывороточных стандартов с известными концентрациями прогестерона позволяет построить калибровочную кривую зависимости активности от концентрации. Концентрации аналита в исследуемых образцах рассчитывают сравнением полученных значений активности с калибровочной кривой.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Конкурентный иммуноанализ (тип 7):

Настоящие реагенты, требующиеся для твердофазного иммуоферментного анализа, включают антитела, конъюгат фермента с антигеном и нативный антиген. При смешивании биотинилированных антител, конъюгата фермент-антиген и нативного антигена, содержащегося в сыворотке, происходит конкуренция между нативным антигеном образца и конъюгатом фермент-антиген за ограниченное число иммобилизованных сайтов связывания.

Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



Ab_{btl} = биотинилированные антитела (постоянное количество)

Ag = нативный антиген (переменное количество)

EnzAg = конъюгат фермент-антиген (постоянное количество)

AgAb_{btl} = комплекс антиген-антитело

$\text{EnzAgAb}_{\text{btl}}$ = комплекс конъюгат - антитела

k_a = константа скорости ассоциации

k_{-a} = константа скорости диссоциации

$K = k_a / k_{-a}$ = константа равновесия

Происходит реакция между биотином, связанным с антителами и стрептавидином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Это позволяет отделить фракцию, связавшуюся с антителами, при декантировании или аспирации.

$\text{AgAb}_{\text{btl}} + \text{EnzAgAb}_{\text{btl}} + \text{стрептавидин}_{\text{cw}} \Rightarrow$ иммобилизованный комплекс

$\text{стрептавидин}_{\text{cw}}$ = стрептавидин, иммобилизованный в лунках

Иммобилизованный комплекс = «сэндвич» комплекс, связанный с твердой фазой (поверхностью лунок)

Активность фермента во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация в образцах.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

- A. Калибраторы Прогестерона- 1 мл/флакон - значки A-G**
7 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями Прогестерона 0 (A), 0.3 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 15 (E), 30.0 (F) и 60.0 (G) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.
Концентрации стандартов могут быть выражены в молях (нмоль/л) умножением на коэффициент 3.18. Например: 1 нг/мл x 3.18 = 3.18 нмоль/л
- B. Ферментный Реагент Прогестерона- 6.0 мл/флакон - значок E**
Один флакон, содержащий конъюгат Прогестерона (аналог) с пероксидазой хрена (HRP) в белковом стабилизирующем растворе, с красным красителем. Хранить при 2-8°C.
- C. Биотинилированный Реагент Прогестерона - 6.0 мл/флакон, значок V**
Один флакон, содержащий биотинилированные антитела к Прогестерону, очищенные конъюгированные кроличьи IgG в буфере, желтый краситель, консервант. Хранить при 2-8°C.
- D. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок J**
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запакованный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- E. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок H**
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.
- F. Субстратный Реагент - 12 мл/флакон - значок S^N**
Один флакон, содержащий ТМБ и H₂O₂ в буфере. Хранить при 2-8°C.
- G. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок STOP**
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.
- H. Инструкция к набору.**

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

Замечание 3: Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозатор на 25 и 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Диспенсеры переменного объема (200–1000 мкл) для конъюгата
4. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
5. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
6. Фильтровальная бумага для высушивания лунок

7. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
8. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
9. Таймер
10. Контрольные материалы

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики *in vitro* Не для внутреннего или наружного использования на людях или животных

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служат кровь, сыворотка. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу. Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.050 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

1. Буфер для промывок

Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
2. Добавьте по 0.025 мл (25 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 10-20 секунд.
5. Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) конъюгата биотин-Прогестерона в каждую лунку.
6. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 10-20 секунд.
7. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
8. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
9. Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).

10. Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

11. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
12. Остановите развитие окраски давлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
13. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

Замечание: Образцы с концентрацией выше 60 нг/мл необходимо развести, в 5 и/или в 10 раз, стандартом «0» или мужской сывороткой с известной низкой концентрацией прогестерона.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации Прогестерона в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

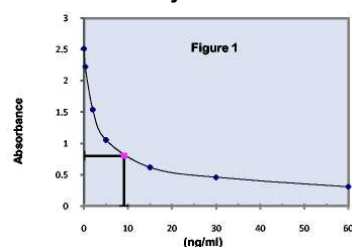
1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации Прогестерона в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите концентрации Прогестерона в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция (0.517) пересекает стандартную кривую при 08.1 нг/мл (см. рис.1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	2.420	2.406	0
	B1	2.391		
Калибратор В	C1	2.155	2.137	0.3
	D1	2.119		
Калибратор С	E1	1.248	1.215	2.0
	F1	1.183		
Калибратор D	G1	0.721	0.719	5.0
	H1	0.717		
Калибратор E	A2	0.338	0.330	15.0
	B2	0.322		
Калибратор F	C2	0.187	0.188	30.0
	D2	0.190		
Калибратор G	G2	0.107	0.105	60.0
	H2	0.104		
Образец	A3	0.525	0.517	8.1
	B3	0.510		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1



11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Калибратора 0 должна быть ≥ 1.3
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

- Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
- Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
- Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
- Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
- Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
- Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
- Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
- Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
- Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
- Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
- Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/СЕ, для данного и других устройств, произведенных *Monobind Inc.*, может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

- Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
- Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализам.
- Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
- Производитель не несет ответственности** за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
- Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции и беременных женщин, ожидаемые значения при использовании данного метода приведены в таблице 1. Во время беременности уровень прогестерона быстро возрастает до конца третьего триместра.

ТАБЛИЦА 1
Ожидаемые значения для прогестерона

	(нг/мл)	(нмоль/л)
Дети, до пубертатного возраста (1-10 лет)	0.07-0.52	0.2-1.7
Взрослые мужчины	0.13-1.22	0.4-3.88
Взрослые женщины		
Фолликулярная фаза	0.15-1.40	0.5-4.4
Лютеиновая фаза	2.0-25.0	6.4-79.5
Беременные женщины		
Первый триместр	7.25-90.0	23-286
Второй триместр	19.5-91.0	62-289
Третий триместр	49.0-422.0	153-1342
Женщины, постменопауза	0.0-0.80	0.0-2.55

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Низкий	20	1.0	0.093	9.3
Нормальный	20	11.1	0.344	3.1
Высокий	20	40.5	1.155	2.9

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Низкий	10	1.1	0.10	9.9
Нормальный	10	10.8	0.76	7.0
Высокий	10	39.2	2.18	5.6

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях в течение 10 дней.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 0.105 нг/мл. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (нг/мл) плюс 2 σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным хемилюминесцентным методом. Использовались образцы с низким, средним и высоким содержанием прогестерона (диапазон значений от <0.15-128 нг/мл). Общее число образцов было 60. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для данного метода в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	14.59	$Y = -1.223 + 1.018(x)$	0.989
Метод сравнения	15.53		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Перекрестные реакции антител к прогестерону с различными веществами оценивались добавлением влияющих веществ в сыворотку в различных концентрациях. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой влияющего вещества и дозой прогестерона, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Перекрестная реактивность
Прогестерон	100.000
17 α -ОН Прогестерон	0.375
Андростендион	0.158
Кортизон	0.014
Кортикостерон	0.347
Кортизол	0.005
Даназол	0.003
Дигидротестостерон	0.006
DHEA-S	0.002
эстрадиол	0.004
Эстрон	0.003
Эстриол	0.002
Преднизон	0.023
Тестостерон	0.015



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»