

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ 17-ОН ПРОГЕСТЕРОНУ МЕТОДОМ ІФА

## 17-ОН Progesterone (17-OHP) Test System

Кат. №: 5225-300А

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 5



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### 1.0 ВСТУП

**Призначення:** Кількісне визначення концентрації 17α-ОН Прогестерону в сироватці або плазмі людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

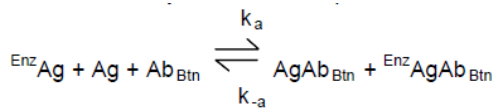
### 2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Конкурентний ферментний імуноаналіз (ТИП 7):

Необхідні для ІФА реагенти включають: антитіла, кон'югат фермент-антиген, нативний антиген.

При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається конкурентна реакція між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість зв'язуючих сайтів антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням.



$\text{Ab}_{\text{Btn}}$  = Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

$\text{Ag}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAg}$  = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{Btn}}$  = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$  = Комплекс кон'югат - антитіла

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

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

Одночасно відбувається реакція між біотином, прикріпленим до антитіл, і стрептавідином, прикріпленим до мікролунок. Це дозволяє відділити зв'язану фракцію антитіл після декантації/аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$  – іммобілізований комплекс

Стрептавідин<sub>CW</sub> = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

#### Матеріали, що постачаються:

##### A. Калібратори 17-ОН Прогестерону - 1 мл (мл)/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для 17α-ОН Прогестерону з концентраціями 0 (A), 0.1 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.5 (E) та 10 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містить консерванти. Концентрації стандартів можуть бути виражені в молях (нМоль/л (nMol/l)) множенням на коефіцієнт 3.03.

Наприклад: 1 нг/мл (ng/ml) x 3.03 = 3.03 нМоль/л (nMol/l)

##### B. Ферментний Реагент 17-ОН Прогестерону - 6 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить кон'югат 17α-ОН Прогестерону (аналог) з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині з буфером, консервантом, інгібіторами зв'язування білка та барвником. Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### C. Біотиновий реагент 17-ОН Прогестерону - 6 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до 17α-ОН Прогестерону, очищені кон'юговані кролячі IgG в буфері, блакитний барвник, консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### D. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл (µg/ml) стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ПАР в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### F. Розчин субстрату - 12 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5 M (M) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### H. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

**Зауваження 2:** Перераховані реагенти для одного 96-лунового мікропланшета.

**Зауваження 3:** Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів ідентифікована на етикетці.

### 4.1 Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (µl)) і 0.050 мл (мл) (50 мкл (µl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (µl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (µl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Диспенсери перемінного об'єму 200-1000 мкл (µl) для розведення кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
6. Фільтрувальний папір для просушування планшета.
7. Поліетиленова плівка чи кришка для інкубації мікропланшета.
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання.
9. Таймер.
10. Контрольні матеріали.

### 5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro  
Не для внутрішнього або зовнішнього використання  
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигена гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, NHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечно видалення компонентів набору повинно відповідати місцевим нормативним вимогам.

### 6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує сироватка чи гепаринова плазма. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для точного порівняння для встановлення нормальних значень слід отримати зразки сироватки вранці натщесерце. Кров слід відбирати в пробірку для венепункції з червоною кришкою (з добавками гелю або без) або для плазми використовуйте вакуумні пробірки, що містять гепарин. Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення отримання зразка натщесерце.

Зразки можуть бути охолоджені до 2-8 °C (°C) на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.050 мл (мл) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролі відповідно з низьким, нормальним і високим діапазоном для відстеження характеристик набору. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик поставлених реагентів. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або деградацію реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний розчин

Розведіть вміст концентрату промивного буферу до 1000 мл (ml) дистильованою чи деіонізованою водою в придатній посудині. Зберігати при кімнатній температурі 2-30°C (°C) до 60 днів.

**Зауваження 1:** Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

**Зауваження 2:** Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, калібратори та контролі повинні досягнути кімнатної температури (20-27°C (°C)).

**\*\*Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим фахівцем\*\***

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, калібраторів і контролів для постановки в дублях. Поверніть смужки, які не використовуються, в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8°C (°C).
2. Додайте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (µl)) калібраторів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) Ферментного Реагенту 17-OH Прогестерону в кожную лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
5. Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) Біотинового реагенту 17-OH Прогестерону в кожную лунку.
6. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
7. Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
8. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантациа.
9. Додайте 350 мкл (µl) буфера для промивок (див. розділ «Підготовка реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповніть кожную лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
10. Додайте по 100 мкл (µl) розчину субстрату в кожную лунку (див. «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

### НЕ СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

11. Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
12. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожную лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте лунки протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
13. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Зауваження:** Зразки з концентрацією вище 10 нг/мл (ng/ml) необхідно розвести, 1:1 та 1:5 «0» стандартом або чоловічою сироваткою з відомою низькою концентрацією 17-OH Прогестерону.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації 17-OH Прогестерону в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожную з двох оптичних густин для кожного стандарту в залежності від концентрації 17α-OH Прогестерону в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.

4. Визначте невідомі концентрації 17α-OH Прогестерону у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.880 перетинає стандартну криву при 1.41 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1).

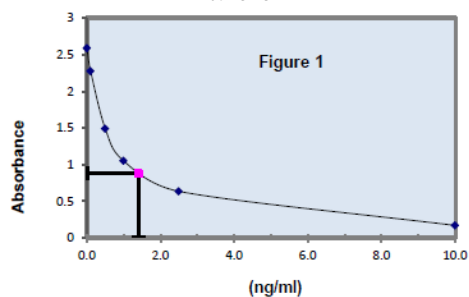
**Примітка:** Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

\*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Приклад 1

| Зразок       | Лунка | Абсорбція (A) | Середнє абсорбції (B) | Значення (нг/мл (ng/ml)) |
|--------------|-------|---------------|-----------------------|--------------------------|
| Калібратор А | A1    | 2.586         | 2.586                 | 0                        |
|              | B1    | 2.586         |                       |                          |
| Калібратор В | C1    | 2.276         | 2.275                 | 0.1                      |
|              | D1    | 2.274         |                       |                          |
| Калібратор С | E1    | 1.509         | 1.486                 | 0.5                      |
|              | F1    | 1.463         |                       |                          |
| Калібратор D | G1    | 1.069         | 1.049                 | 1.0                      |
|              | H1    | 1.030         |                       |                          |
| Калібратор E | A2    | 0.642         | 0.634                 | 2.5                      |
|              | B2    | 0.626         |                       |                          |
| Калібратор F | C2    | 0.172         | 0.169                 | 10.0                     |
|              | D2    | 0.166         |                       |                          |
| Пацієнт 1    | A3    | 0.876         | 0.880                 | 1.41                     |
|              | B3    | 0.884         |                       |                          |

Малюнок 1



## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

1. Оптична густина Калібратора 0 нг/мл (ng/ml) повинна бути  $\geq 1.3$ .
2. Чотири з шести контролів якості повинні впадати в установлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS і форма аналізу ризику для цього продукту доступні за запитом від компанії Monobind Inc.

### 12.1 Якість набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.

- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ІФА були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тестовими реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто спричиняють ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. (Boscato LM Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin. Chem 1988:3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу слід використовувати у поєднанні з клінічним обстеженням, історією хворого та усіма іншими клінічними даними.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

### 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції і жінок при вагітності очікувані значення при використанні даного методу ІФА наведені в таблиці:

**Таблиця 1**  
Очікувані значення для Тест-системи для визначення 17-ОН Прогестерону AccuBind® ІФА

|   | нг/мл<br>(ng/ml) | нмоль/л<br>(nmol/l) |
|---|------------------|---------------------|
| Діти в препубертатному періоді (1-10 років) | 0.2-0.8          | 0.64-2.54           |
| Дорослі чоловіки                            | 0.2-3.1          | 0.64-9.86           |
| <b>Дорослі жінки</b>                        |                  |                     |
| Фолікулярна фаза                            | 0.2-1.3          | 0.64-4.13           |
| Лютеїнова фаза                              | 1.0-4.51         | 3.18-14.34          |
| <b>Жінки постменопауза</b>                  | 0.2-0.9          | 0.64-2.86           |

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірених і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому знаходиться лабораторія.

### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

#### 14.1 Точність

Точність Тест-системи 17-ОН Прогестерон AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Число, значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

**ТАБЛИЦЯ 2**

Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

| Зразок     | N  | x    | δ    | C.V., % |
|------------|----|------|------|---------|
| Низький    | 20 | 0.94 | 0.06 | 8.5%    |
| Нормальний | 20 | 3.25 | 0.22 | 6.7%    |
| Високий    | 20 | 7.38 | 0.43 | 5.8%    |

**ТАБЛИЦЯ 3**

Точність між аналізами (нг/мл (ng/ml))

| Зразок     | N  | x    | δ    | C.V., % |
|------------|----|------|------|---------|
| Низький    | 10 | 0.88 | 0.07 | 8.0%    |
| Нормальний | 10 | 3.12 | 0.24 | 7.7%    |
| Високий    | 10 | 7.55 | 0.48 | 6.4%    |

\*Вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях протягом 10 днів.

#### 14.2 Чутливість

Тест-система 17-ОН Прогестерон AccuBind® ІФА має чутливість 0.077 нг/мл (ng/ml). Чутливість визначали за допомогою мінливості 0 нг/мл (ng/ml) калібратора сироватки та використовуючи статистику 2σ (95% достовірність) для розрахунку мінімальної дози.

#### 14.3 Достовірність

Тест-систему 17-ОН Прогестерон AccuBind® ІФА порівнювали з референсним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом 17α-ОН Прогестерону (діапазон значень < 0.15-128 нг/мл (ng/ml)). Загальне число зразків було 66. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

**ТАБЛИЦЯ 4**

| Метод           | Середнє (x) | Рівняння               | Коефіцієнт кореляції |
|-----------------|-------------|------------------------|----------------------|
| Цей метод (Y)   | 3.49        | y = 0.2232 + 1.065 (x) | 0.957                |
| Референсний (X) | 3.19        |                        |                      |

Було знайдено лише незначне розходження даного методу і референсного методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують чудову узгодженість методів.

#### 14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин у різних концентраціях до сироваткової матриці. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

| Речовина           | Перехресна реактивність |
|--------------------|-------------------------|
| 17α-ОН Прогестерон | 100.000                 |
| Прогестерон        | 0.375                   |
| Андростенедіон     | 0.158                   |
| Кортизон           | 0.014                   |
| Кортикостерон      | 0.347                   |
| Кортизол           | 0.005                   |
| Даназол            | 0.003                   |
| Дигідротестостерон | 0.006                   |
| ДГЕА-сульфат       | 0.002                   |
| Естрадіол          | 0.004                   |
| Естрон             | 0.003                   |
| Естріол            | 0.002                   |
| Преднізон          | 0.023                   |
| Тестостерон        | 0.015                   |
| РФ                 | < 0.001                 |



#### ВИРОБНИК

|  |  |
|--|--|
| MONOBIND INC.<br>100 North Pointe Dr.<br>Lake Forest, CA 92630 - USA<br>Phone: 949.951.2665<br>Fax: 949.951.3539<br><a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a> | МОНОБАЙНД ІНК<br>100 Норд Поїнт Драйв<br>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США<br>Тел.: 949.951.2665<br>Факс: 949.951.3539<br><a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a> |
|--|--|



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

