

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ 17-ОН ПРОГЕСТЕРОНУ ВИСОКОЧУТЛИВОГО МЕТОДОМ ІФА

## 17 $\alpha$ -OH Progesterone Scientific Unit (17-OHP-SI) Test System

Кат. №: 9925-300A

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 співпадатти.

### 1.0 ВВЕДЕННЯ

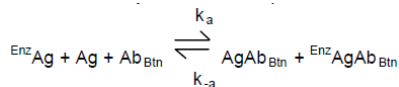
**Призначення:** Кількісне визначення концентрації 17 $\alpha$ -ОН Прогестерону в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

**2.0 ВСТУП** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Конкурентний імуоферментний аналіз (ТИП 7):

Основні реагенти, необхідні для імуоферментного аналізу, включають антитіло, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген. При змішуванні біотинильованого антитіла, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція конкуренції між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген для обмеженої кількості сайтів зв'язування антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{Btn}}$  = Біотинильоване антитіло (постійна кількість)

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

$\text{EnzAg}$  = Фермент-антиген кон'югат (постійна величина)

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

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$  = Комплекс кон'югат фермент-антиген-антитіло

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

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

Виникає одночасна реакція між біотином, пов'язаним з антитілом, та стрептавідином, іммобілізованим у мікролуночці. Це впливає на поділ фракцій, пов'язаної з антитілами, після декантації або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \Rightarrow$  іммобілізований комплекс

$\text{Streptavidin}_{\text{CW}}$  = Стрептавідин іммобілізований в луночці

Іммобілізований комплекс = Сендвіч-комплекс, зв'язаний з твердою поверхнею

Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. За допомогою декількох різних сироваткових референсних матеріалів відомих концентрацій антигену може бути сформована крива реакції на дозу, з якої можна встановити невідому концентрацію антигену.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

**Матеріали, що постачаються:**

#### A. Калібратори 17-OHP-SI - 2 мл (мл) - Піктограма A та 1 мл (мл)/флакон - Піктограма B-G

Сім (7) флаконів сироваткового референсного матеріалу для 17 $\alpha$ -ОН Прогестерону в концентраціях 0 (A), 0.1 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.5 (E), 10 (F) і 20 (G) нг/мл (ng/ml). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Додано консервант. Калібратори можна визирати в молярних концентраціях (нМ/л (nMol/l)), помноживши на 3.03.

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

#### B. Ферментний реагент 17-OHP-SI - 6 мл (мл)/флакон

Один (1) готовий до використання флакон, що містить кон'югат 17-OHP (аналог)-пероксида хрому (HRP) у стабілізуючій білок матриці з буфером, червоним барвником, консервантом та інгібіторами зв'язування білка. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### C. Біотиновий реагент 17-OHP-SI - 6 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить біотинильований очищений кон'югат IgG кролика анти-17 $\alpha$ -ОН Прогестерон у буфері, синій барвник та консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### D. Пластина з нанесеним Стрептавідином - 96 лунок

Один мікропланшет із 96 лунками, покритий 1.0 мкг/мл ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) стрептавідину, упакований в пакет із сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

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

Один (1) флакон, що містить сурфактант у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### F. Розчин субстрату - 14 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) та пероксид водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

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

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5 М (M)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### H. Інструкції

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

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

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшету.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл ( $\mu\text{l}$ )), 0.050 мл (мл) (50 мкл ( $\mu\text{l}$ )) та 0.100 мл (мл) (100 мкл ( $\mu\text{l}$ )) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.050 мл (мл) (50 мкл ( $\mu\text{l}$ )), 0.100 мл (мл) (100 мкл ( $\mu\text{l}$ )) та 0.350 мл (мл) (350 мкл ( $\mu\text{l}$ )) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані методами, схваленими FDA, в яких отримано негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену 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», 2-е видання, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками повинна бути сироватка крові або гепаринізована плазма за типом, забрані із звичайними запобіжними заходами при відборі зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід відбирати в пробірку для венепункції (з гелевими добавками або без них) або для плазми використовуйте вакуумні пробірки, що містять гепарин. Дозвольте крові згорнутися для зразків сироватки. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

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 протягом ночі для забезпечення зразка натщесерце.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C (°C) протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразок (и) не вдається проаналізувати протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу в дублях потрібно 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях низького, середнього та високого діапазонів кривої відповідності дози для контролю ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Розведений буфер можна зберігати при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

**Примітка:** Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактерії.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перш проведенням аналізу, доведіть всі реагенти, референсні сироваткові калібратори та контролю до кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

**\*\*Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем\*\***

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).
- Внесіть по 0.025 мл (ml) (25 мкл (µl)) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) готового до використання ферментного реагенту 17-OHP-SI в кожен лунку.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) біотинового реагенту 17-OHP-SI у всі лунки.
- Акуратно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати.
- Накрийте кришкою та інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (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, наповнити кожен лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) розчину субстрату в кожен лунку. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і інкубуйте 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.
- 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.

**Примітка:** Розведіть зразки, з підозрілими концентраціями вище 20 нг/мл (ng/ml) 1:1 і 1:5, калібратором 17-ОН Прогестерону 0 нг/мл (ng/ml) або пулованою чоловічою сироваткою з відомим низьким значенням для 17-ОН Прогестерону.

## 10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

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

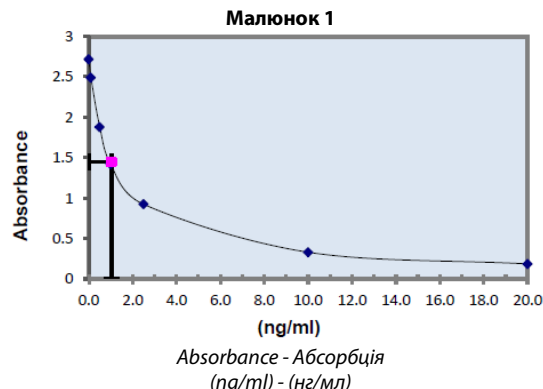
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації 17-ОНР в нг/мл (ng/ml) на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію 17-ОНР для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у нг/мл (ng/ml)) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (0.880) перетинає криву реакції на дозу при концентрації 17-ОНР 1.41 нг/мл (ng/ml) (див. Малюнок 1).

**Примітка:** Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	2.721	2.715	0
	B1	2.710		
Калібратор В	C1	2.465	2.488	0.1
	D1	2.511		
Калібратор С	E1	1.888	1.880	0.5
	F1	1.872		
Калібратор D	G1	1.417	1.420	1.0
	H1	1.423		
Калібратор E	A2	0.918	0.923	2.5
	B2	0.928		
Калібратор F	C2	0.324	0.330	10
	D2	0.336		
Калібратор G	E2	0.186	0.186	20
	F2	0.186		
Пацієнт	G2	1.443	1.448	1.04
	H2	1.452		

\*Дані, наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1, служать лише для ілюстрації і не повинні використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.



## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна Оптична щільність Калібратора 0 нг/мл (ng/ml)  $\geq$  1.3
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

### 12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
4. 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.
5. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
6. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
7. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
8. Правильне і точне дозування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
9. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
10. Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування 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

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
2. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
3. Реагенти для процедур тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscatto LM, Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. **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.**

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

За погодженням із встановленими контрольними інтервалами для «нормальної» дорослої популяції очікувані діапазони для тест-системи ІФА 17-ОН Прогестерону високочутливого AccuBind® детально описані в Таблиці 1, а для жінок під час вагітності - в Таблиці 2.

ТАБЛИЦЯ 1  
17-ОН-PSI, Очікувані значення

Населення	(нг/мл (ng/ml))	(нмоль/л (nmol/l))
Дитина допубертатного віку (1-10 років)	0.2-0.8	0.64-2.54
Дорослий чоловік	0.2-3.1	0.64-9.86
<b>Доросла жінка</b>		
Фолікулярна фаза	0.4-1.51	1.28-4.83
Лютетінова фаза	1.00-4.51	3.18-14.34
<b>Жінка в постменопаузі</b>	0.2-0.9	0.64-2.86

ТАБЛИЦЯ 2  
17-ОН-PSI, Очікувані значення гестації

Тиждень вагітності	нмоль/л (nmol/l)	нг/мл (ng/ml)
1-6	4-10	1.32-3.30
7-14	3-9	1.1-2.8
15-24	5-14	1.65-4.62
25-33	6-31	1.98-10.2
34-40	8-36	2.64-13.20

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції «нормальних» людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. 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 розташована лабораторія.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 14.1 Точність

Точність Тест-системи 17-ОН-PSI AccuBind® ІФА в межах та між аналізами визначали за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольних пулованих сироваток. Кількість, середні значення, середнє відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблицях 2 та 3.

ТАБЛИЦЯ 2  
Точність в аналізі (значення в нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	X	$\sigma$	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 (значення в нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	X	$\sigma$	C.V.
Низький	10	0.88	0.07	8.0%
Нормальний	10	3.12	0.27	7.7%
Високий	10	7.55	0.48	6.4%

\*Виміряно в десяти експериментах в дублях протягом 10 днів.

### 14.2 Достовірність

Тест-систему 17-ОН-PSI AccuBind® ІФА порівнювали з методом хемілюмінесцентного імунологічного аналізу. Використовували біологічні зразки з популяції із низьким, нормальним та високим рівнем 17-ОН Прогестерону (значення варіювали від  $< 0.15$  нг/мл (ng/ml) до 128 нг/мл (ng/ml)). Загальна кількість таких зразків становила 66. Рівняння найменшої квадратної регресії та коефіцієнт кореляції були розраховані для цього методу порівняно з еталонним методом. Отримані дані відображаються в Таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Monobind (Y)	3.49	$Y = 0.2232 + 1.065(x)$	0.957
Референсний(X)	3.19		

Лише незначні відхилення між цим методом та еталонним методом вказують на близькість середніх значень. Рівняння найменшої квадратичної регресії та коефіцієнт кореляції свідчать про відмінне узгодження методів.

### 14.2 Чутливість

Тест-система 17-ОН-PSI AccuBind® ІФА має чутливість 0.03 нг/мл (ng/ml). Чутливість визначали, використовуючи мінливість калібратора сироватки 0 нг/мл (ng/ml) та використовуючи статистику  $2\sigma$  (95% достовірність) для розрахунку мінімальної дози.

### 14.4 Специфічність

% Перехресної реактивності антитіл 17-ОН-PSI до вибраних речовин оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозами інтерферуючої речовини та дозою 17-ОН Прогестерону, необхідною для витіснення тієї ж кількості міченого аналога.

ТАБЛИЦЯ 5

Речовина	Перехресна реактивність
17 $\alpha$ -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**

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

