

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

**РИА-ПРОГЕСТЕРОН-СТ  
ТУ РБ 03535291.017-96 Зам.6**

**Б.1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА**

Б. 1.1 Набор РИА-ПРОГЕСТЕРОН-СТ предназначен для определения концентрации прогестерона в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа. Набор предназначен для применения только *in vitro*.

Б. 1.2 Прогестерон - стероидный гормон с молекулярным весом 314 дальтон, который синтезируется желтым телом яичников, а при беременности продуцируется плацентой. Основной функцией прогестерона являются подготовка эндометрия к имплантации оплодотворенной яйцеклетки и поддержание беременности, а также участие в регуляции менструального цикла. Определение уровня прогестерона в сыворотке крови применяется для подтверждения овуляции и может служить индикатором лютеинизации. У мужчин и детей определение прогестерона используется при возможных энзиматических нарушениях биосинтеза стероидов.

Количественное определение прогестерона необходимо для диагностики и контроля за лечением нарушений функций репродуктивной системы.

**Б.2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

**Б.2.1 Состав набора:**

- [<sup>125</sup>I]-прогестерон, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 53 мл, общая активность (70-150) кБк;

- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к прогестерону, готовы к использованию, 100 шт.;

- шесть калибровочных проб в диапазоне концентраций прогестерона (0; 1-120) нмоль/л (точные значения концентраций прогестерона указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,50 мл;

контрольная сыворотка (КС) содержит известное количество прогестерона (диапазон концентраций прогестерона указывается на этикетке), жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 0,50 мл.

Б.2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 43 неизвестных проб, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 100 определений.

Б.2.3 Продолжительность анализа 2 ч.

Б.2.4 Диапазон определяемых концентраций прогестерона (0,3-120) нмоль/л.

Б.2.5 Принцип работы набора основан на методе одностадийного твердофазного конкурентного радиоиммунологического анализа (РИА).

В пробирки, покрытые моноклональными антителами к прогестерону, вносятся пробы сыворотки крови пациента, контрольная сыворотка и калибровочные пробы, а затем добавляется прогестерон, меченый йодом-125.

Меченый и немеченый антигены конкурируют за ограниченное число участков связывания моноклональных антител, иммобилизованных на стенках пробирки. Реакция антигенов с антителами приводит с течением времени к состоянию равновесия между свободными и связанными антигенами. После инкубации в пределах определенной области концентраций антигенов, количество включившегося в состав иммунных комплексов меченого антигена ( $[^{125}\text{I}]$ -прогестерон) обратно пропорционально количеству немеченого антигена (эндогенный прогестерон) в пробе.

Разделение свободного и связанного антителами прогестерона осуществляют удалением инкубационной среды из пробирок.

Концентрацию прогестерона в неизвестных образцах находят по калибровочному графику зависимости связанного  $[^{125}\text{I}]$ -прогестерона от концентрации прогестерона в калибровочных пробах.

### Б.3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Б.3.1  $[^{125}\text{I}]$ -прогестерон является источником мягкого гамма-излучения.

Период полураспада изотопа  $^{125}\text{J}$  - 60,1 сут.

При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее - РВ) согласно требованиям санитарных норм и правил «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2013 г № 137.

**ВНИМАНИЕ!** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

Б.3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

Б.3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], [3], [4], [5]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [6].

Б.3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

Б.3.5 Все радиоактивные отходы, образованные в процессе использования набора собираются, хранятся и удаляются в соответствии с требованиями [8].

#### Б.4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Б.4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

Б.4.2 Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, не пригодны для анализа.

Б.4.3 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- температура в помещении, где проводится анализ, должна быть (18-25) °С;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- не допускается использование реагентов с нарушением герметичности упаковки;
- использовать только новые наконечники для внесения каждого образца и реагента;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования.

#### Б.5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Б.5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:
  - гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [<sup>125</sup>I];
  - прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
  - вихревой смеситель;
  - водоструйный насос;

пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 до 5,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

- штатив для пробирок;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства.

## Б.6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Б.6.1 Образцы сывороток крови, в том числе полученных с помощью активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него), могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8)°С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре ниже минус 20 °С в течение трех месяцев, при температуре минус 70 °С в течение двух лет. Не использовать сыворотки, которые замораживались/размораживались более двух раз.

Б. 6.2 Размораживание образцов сывороток проводить при температуре (18-25) °С. Образцы тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин для достижения однородности.

Б.6.3 Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

Б.6.4 Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

## Б.7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Б.7.1 Перед использованием выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сывороток крови при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

Б.7.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать крышками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в плотно закрытой первичной упаковке при (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

## Б.8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Б.8.1 Пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к прогестерону маркировать следующим образом (в дубликатах):

В<sub>0</sub>-В<sub>5</sub> - для калибровочных проб кортизола;

$V_{кc}$  - для КС;

$V_x$  - для исследуемых проб сыворотки крови человека.

Б.8.2 В пробирки  $V_0$ - $V_5$  внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки  $V_{кc}$  внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки  $V_x$  внести по 0,05 мл (50 мкл) исследуемых сывороток крови человека.

Б.8.3 Во все пробирки внести по 0,5 мл (500 мкл) [ $^{125}I$ ]-прогестерона.

Б.8.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 1 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25) °С.

Б.8.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

Б.8.6 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [ $^{125}I$ ] в каждой пробирке в течение 1 мин.

Б.8.7 Последовательность операций анализа приведена в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибровочные пробы, КС и исследуемые сыворотки крови	[ $^{125}I$ ]-прогестерон, мл	Инкубировать 1 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С	Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса
$V_0$ - $V_3$	0,05	0,5		
$V_{кc}$	0,05	0,5		
$V_x$	0,05	0,5		
Измерить скорость счета [ $^{125}I$ ] в каждой пробирке в течение 1 мин				

## Б.9 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

Б.9.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [ $^{125}I$ ] для каждой пары пробирок,

Б.9.2 Рассчитать величину  $(V_i/V_0) \times 100$ , в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки или исследуемой сыворотки крови человека, где  $V_i$  - среднее арифметическое значение скорости счета [ $^{125}I$ ] в пробирках  $V_1$ - $V_5$ ,  $V_{кc}$  и  $V_x$ .

Б.9.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения  $(V_i/V_0) \times 100$ , в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций прогестерона, в нмоль/л, в соответствующих калибровочных пробах; либо в координатах logit-log.

Б.9.4 Определить по калибровочному графику концентрацию прогестерона, в нмоль/л, в КС и исследуемых сыворотках крови человека.

Для перевода молярной концентрации прогестерона в массовую следует пользоваться соотношением:  $\text{мкг/л} = \text{нмоль/л} \times 0,314$

## Б. 10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### Б. 10.1 Чувствительность

Минимальная концентрация прогестерона, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,3 нмоль/л.

### Б. 10.2 Специфичность

Использование высокоочищенных моноклональных антител к прогестерону обеспечивает высокую специфичность анализа.

Перекрестная реакция моноклональных антител к прогестерону со структурными аналогами прогестерона приведена в таблице Б.2.

Таблица Б. 2

Исследуемые вещества	Перекрестная реакция, %
Прогестерон	100
17-гидрокси прогестерон	1
5 -альфа-прегнандион	9,6
Прегненолон	0,09
Кортизол	0,002
Кортикостерон	0,02
11 -деоксикортизол	0,02
11-дезоксикортикостерон	0,32
Даназол	0,04
Эстрадиол	0,02
Эстриол	0,01
Эстрон	0,01
Тестостерон	0,02

### Б. 10.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n—10) концентрации прогестерона в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием прогестерона не превышает 8%.

### Б. 10.4 Тест на «открытие»

Процент «открытия» прогестерона, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией прогестерона, составляет (80-120) %.

### Б. 10.5 Клиническая проверка набора

Концентрация прогестерона в сыворотке крови, определенная с помощью набора, составляет: мужчины - (0,4-4,0) нмоль/л; женщины, фолликулярная фаза - менее 5 нмоль/л, лютеиновая фаза — (8-78) нмоль/л, беременность (3-й триместр) - (30-300) нмоль/л.

Приведенные значения являются ориентировочными. Рекомендуется в каждой лаборатории установить собственные уровни прогестерона, соответствующие нормальным.

Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данных других тестов и иной подходящей информации.

## Б.11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Б.11.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение

всего срока годности набора.

Б.11.2 Срок годности набора - 60 суток.

Б.11.3 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пилотирования.

Б.11.4 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

### Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	<b>Серийный номер</b> Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	<b>Использовать до</b> Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
[IVD]	<b>Изделие для диагностики in vitro</b>
	<b>Ограничение температуры</b> Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	<b>Изготовитель</b> Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	<b>Обратитесь к руководству по эксплуатации</b> Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия
	<b>Содержимого достаточно для проведения n - тестирований</b> Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	<b>Знак радиационной опасности</b> Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [ <sup>125</sup> I] в наборе, кБк

■ ■ УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3,

220141, г. Минск, Республика Беларусь

Тел./факс +375-17- 272-52-57

E-mail: [hopmang.bel@gmail.com](mailto:hopmang.bel@gmail.com),

<http://www.hopiboh.org>

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК, тел. +375-17-396-87-38

## Библиография

- [1] Нормы МАГАТЭ по безопасности для защиты людей и охраны окружающей среды, № TS-R.-1-1  
Правила безопасной перевозки радиоактивных материалов, 2009 г.
- [2] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
- [3] СП 17-69 РБ-98  
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г. № 18
- [4] Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республ<sup>и</sup> Беларусь от 06.02.2017 г. № 2
- [5] Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 г. № 11
- [6] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165  
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»
- [7] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.07.2019 № 74  
«О проведении обязательных и внеочередных медицинских осмотров работающих»
- [8] Санитарные нормы и правила «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при обращении с радиоактивными отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2015 г. № 142