



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купрэвича, 5, корп. 3
Факс (017) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАКТИВОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ИФА-ПРОГЕСТЕРОН

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-ПРОГЕСТЕРОН предназначен для количественного определения прогестерона в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Количественное определение уровня прогестерона в крови имеет диагностическое значение при оценке функции репродуктивной системы.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- иммуносорбент – 96-луночный стриповый планшет с иммобилизованными антителами к прогестерону, 1 планшет;
- калибровочные пробы в диапазоне концентраций прогестерона (0-100) нмоль/л (точные значения концентраций прогестерона указываются на этикетках), жидкие препараты, 6 флаконов по 0,5 мл. Калибровочные пробы прогестерона откалиброваны относительно контрольных сывороток "BIO-RAD", США, кат.№ 371, 372, 373;
- контрольная сыворотка (КС), жидкий препарат, 1 флакон; 0,5 мл;
- конъюгат – прогестерон, меченный пероксидазой из корней хрена, жидкий препарат, 1 флакон; 12 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), жидкий препарат, 1 флакон, 13 мл;
- раствор ТМБ (хромоген 3,3',5,5'-тетраметил-бензидин), жидкий препарат, 1 флакон; 1,0 мл;
- концентрат раствора для промывания планшета (КРП), жидкий препарат, 1 флакон, 20 мл;
- стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, 13 мл.

Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор ТМБ могут поставляться в одном флаконе.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, одной контрольной и 6 калибровочных проб - всего 96 определений.

Количество реагентов рассчитано на 3 постановки по 4 стрипа.

2.3 Принцип работы набора состоит в следующем: в лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным прогестероном сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами прогестерона и конъюгата. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству прогестерона в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с хромоген-субстратом происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата. После измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках на основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация прогестерона в определяемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

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

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

3.4 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 4.1 Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- термостат;
- вихревой смеситель;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,025 до 5,0 мл;
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл;
- стаканы лабораторные стеклянные вместимостью 200-1000 мл;
- флаконы вместимостью 10 и 20 мл;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри;
- клейкая лента или крышка;
- вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

5.2 Вскрыть упаковку и снять защитную пленку с иммуносорбента.

5.3 Микропробирки (флаконы) с калибровочными пробами и КС интенсивно встряхнуть, избегая образования пены.

5.4 Приготовление раствора для промывания планшета

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть и отобрать в мерный стакан необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), довести дистиллированной водой до нужного объема и перемешать. Раствор для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 3 сут.

5.5 Приготовление хромоген-субстратного раствора

В чистый флакон с пробкой отобрать определенный объем СБР, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), и необходимый объем раствора ТМБ. Смесь тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием хромоген-субстратный раствор должен быть бесцветным.

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Проявитель	
	КРП, мл	Дистиллированная вода, до мл	Раствор ТМБ, мл	СБР, мл
4	5	200	0,2	4
8	10	400	0,4	8
12	20	800	0,6	12

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах маркировать следующим образом: №1 - В₀, №2 - В₁, №3 - В₂, №4 - В₃, №5 - В₄, №6 - В₅, В_х - исследуемые образцы.

6.2 Отобрать из каждой микропробирки (флакона) с калибровочными пробами, контрольной сывороткой и исследуемыми образцами по 0,025 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.3 Во все промаркированные лунки внести по 0,1 мл раствора конъюгата.

6.4 Инкубировать планшет при температуре (18-25) °С в течение 2 часов.

6.5 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 4 раза раствором для промывания планшета, приготовленным по п. 5.4 (по 0,2 мл в каждую лунку). Удалить содержимое лунок, тщательно стряхнув планшет над раковиной.

6.6 Во все лунки внести по 0,1 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного согласно п.5.5

6.7 Инкубировать планшет при температуре (18-25) °С в темноте, в течение 15-25 мин., в зависимости от степени развития окраски.

6.8 Остановить реакцию добавлением во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента.

6.9 Измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм в течение 30 мин после остановки реакции.

6.10 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в оптических единицах (ОЕ), а по оси абсцисс – значения концентраций прогестерона, в нмоль/л, в соответствующих калибровочных пробах.

По калибровочному графику определить содержание прогестерона в исследуемых образцах.

7 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

7.1 Специфичность.

Перекрестная реакция антител к прогестерону с другими стероидами приведена в таблице 2.

Таблица 2

Стероид	Перекрестная реакция, %
Прогестерон	100
Эстриол	0,2
Преднизолон	0,6
11-Дезоксикортизол	0,09
Кортикостерон	0,06
Дезоксикортикостерон	<0,1
Прегненолон	<0,1
Тестостерон	<0,1

7.2 Чувствительность

Минимальная концентрация прогестерона, достоверно определяемая с помощью набора, составляет не более 0,5 нмоль/л.

7.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации прогестерона в образцах сыворотки крови с использованием набора не превышает 10%.

7.4 Тест на "открытие"

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

7.5 Клиническая проверка набора

Содержание прогестерона в сыворотке крови у здоровых доноров составляет: мужчины – до 4 нмоль/л, женщины: фолликулярная фаза – 0,1-5 нмоль/л, лютеиновая фаза – 6-78 нмоль/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций прогестерона, соответствующие нормальным.

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

8.2 Не смешивать реактивы из разных серий.

8.3 Не держать реактивы во время хранения и инкубации на ярком свете.

8.4 Исследуемые образцы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 48 ч после взятия пробы. Для более длительного хранения образцы следует заморозить при температуре не менее минус 20 °С.

8.5 Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизованную, мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

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

8.7 Срок годности набора 6 месяцев с даты изготовления набора.