



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Факс (37517) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА В МОЛОКЕ КОРОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М

Утверждена Главным управлением ветеринарии Министерства
сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь
25.08.2005г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор реагентов для определения прогестерона в молоке коров методом иммуноферментного анализа ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М предназначен для количественного определения прогестерона в молоке коров.

1.2 Прогестерон – стероидный гормон с молекулярным весом 314. Количественное определение уровня прогестерона в молоке имеет диагностическое значение при оценке состояния фетоплацентной системы и может быть использовано для определения стельности коров.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- иммуносорбент - 1 планшет;
- калибровочные пробы в диапазоне концентраций прогестерона (0-100) нг/мл 6 фл., 0,5 мл;
- контрольная проба (КП) 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат 1 фл., 21 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) 1 фл., 12 мл;
- раствор ТМБ 1 фл., 0,7 мл;
- стоп-реагент 1 фл., 6 мл

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, 1 контрольной и 6 калибровочных проб – всего 96 определений.

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 молока 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 пробы молока. Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата. Пероксидную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента, содержащего 0,5 М серную кислоту. После измерения оптической плотности 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. данным набором определяют прогестерон в различных образцах молока коров, которые следует рассматривать как потенциально инфицированный материал.

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

3.3 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);
- вихревой смеситель;
- встряхиватель для планшетов;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 до 1,0 мл;

- пипетки полуавтоматические 8-ми канальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,05 до 0,3 мл;

- цилиндр мерный вместимостью 20 мл;
- кювета для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки;
- флакон вместимостью 20 мл;
- пробирки вместимостью (3-5) мл;
- вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Подготовка стрипов

Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете без доступа влаги при температуре (2-8) °С в течение трех месяцев.

5.3 Калибровочные пробы, КП, конъюгат, стоп-реагент готовы к использованию.

После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)°С не более 1 месяца.

Перед работой флаконы с калибровочными пробами и КП интенсивно встряхнуть, избегая образования пены.

5.4 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.

Количество используемых стрипов	Раствор ТМБ, мл	СБР, мл
4	0,2	4
8	0,4	8
12	0,6	12

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.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 В зависимости от количества определяемых образцов подготовить необходимое количество реагентов, которые перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и выдержаны при температуре (18-25)°С в течение 30 мин.

6.2 Внести в соответствующие лунки по 0,02 мл калибровочных проб, контрольной пробы и анализируемых образцов (тщательно перемешанных!) в дубликатах..

6.3 Во все лунки внести по 0,2 мл конъюгата.

6.4 Планшет заклеймить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в течение 2 ч при температуре (18-25) °С, или 1 ч. при температуре 37 °С.

6.5 По окончании инкубации удалить содержимое лунок, тщательно стряхнув планшет над раковиной. Все лунки промыть 3 раза дистиллированной водой (по 0,3 мл в каждую лунку). Тщательно удалить остатки влаги из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

6.6 Во все промытые лунки немедленно внести по 0,1 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п.5.4 и инкубировать при температуре (18-25)°С в темном месте в течение 15-25 мин по мере развития окраски.

6.7 Остановить реакцию добавлением во все лунки планшета по 0,05 мл стоп-реагента.

6.8 Измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм в течение 15 мин после остановки реакции.

7 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1 Рассчитать величину $V_i/V_0 \times 100\%$ для каждой калибровочной пробы и исследуемого образца, где V_i – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные пробы или исследуемые образцы; V_0 – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу «0 нг/мл»..

7.2 В координатах «logit-log» построить для калибровочных проб график зависимости $V_i/V_0 \times 100\%$ от концентрации прогестерона в калибровочных пробах (нг/мл).

7.3 Определить по калибровочному графику содержание прогестерона в исследуемых образцах. При наличии программируемого ридера возможен автоматический расчет результатов анализа.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 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

8.2 Чувствительность

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

8.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации прогестерона в молоке коров с использованием набора не превышает 10 %.

8.4 Тест на «открытие»

При постановке теста на «открытие» смешивают равные объемы контрольной и калибровочной проб. Процент «открытия» составляет (85-115)%.

8.5 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора «ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М» провести наработку собственных лабораторных данных, отражающих уровень прогестерона в молоке коров, соответствующих данному физиологическому состоянию животного.

В таблице 3 приведены ориентировочные данные, полученные при измерении концентрации прогестерона в молоке коров.

Таблица 3

Состояние животного	Концентрация прогестерона, нг/мл
Стельные	более 7
Сомнительные	4-7
Нестельные	менее 4

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Набор должен храниться в сухом помещении при температуре (2-8)⁰С в течение всего срока годности.

9.2 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо для каждого независимого эксперимента построение новой калибровочной кривой.

9.3 Не допускается смешивание компонентов наборов разных серий.

9.4 Не допускается при промывании лунок использовать растворы из других наборов, т.к. они могут содержать азид натрия. Азид натрия даже в следовых количествах ингибирует маркерный фермент – пероксидазу, что может привести к снижению сигнала.

9.5 Исследуемые пробы молока должны быть чистыми (без примесей) и однородными.

9.6 Молоко может храниться при температуре (2-8)⁰С в течение 48 ч. Для более долгого хранения допускается однократное замораживание до температуры не менее минус 20⁰С. Повторное замораживание не допускается.

9.7 Каждый образец молока, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

9.8 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

9.9 Срок годности набора 6 месяцев от даты изготовления.