«УТВЕРЖДЕНА»
Приказом Росздравнадзора
от «17» ноября 2011 г. № 7418-Пр/11

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **17-ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА** В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(«СтероидИФА-17-ОН-прогестерон»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» предназначен для количественного определения 17-ОН-прогестерона в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. 17-ОН-прогестерон – стероид с молекулярной массой 330,5 Да, промежуточный продукт синтеза ряда стероидных гормонов. Его образование происходит в коре надпочечников и половых железах.

Уровень 17-ОН-прогестерона изменяется в течение суток и коррелирует с секрецией кортизола. Его максимальное содержание выявляется в образцах, полученных в утренние часы.

У небеременных женщин уровень 17-ОН-прогестерона в крови зависит от фазы менструального цикла. Как и прогестерон, 17-ОН-прогестерон секретируется зрелым фолликулом и желтым телом, поэтому его концентрация в крови выше в лютеиновой фазе. Во время беременности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

уровень стероида существенно возрастает за счёт его синтеза корой надпочечников плода и плацентой.

Измерение содержания 17-ОН-прогестерона в сыворотке и плазме крови может использоваться для мониторинга активности 21-гидроксилазы коры надпочечников. При врожденной гиперплазии коры надпочечников уровень 17-ОН-прогестерона в периферической крови существенно повышен из-за дефицита 21-гидроксилазы. В то время как дефицит 11-гидроксилазы приводит лишь к умеренному повышению содержания 17-ОН-прогестерона. Таким образом, установление уровня этого стероида играет важную роль в дифференциальной диагностике врожденной гиперплазии коры надпочечников.

1.3. Набор «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата 17-ОН-прогестерон-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

эндогенным 17-ОН-прогестероном сыворотки или плазмы крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству 17-ОН-прогестерона в исследуемом образце (Рисунок 1).

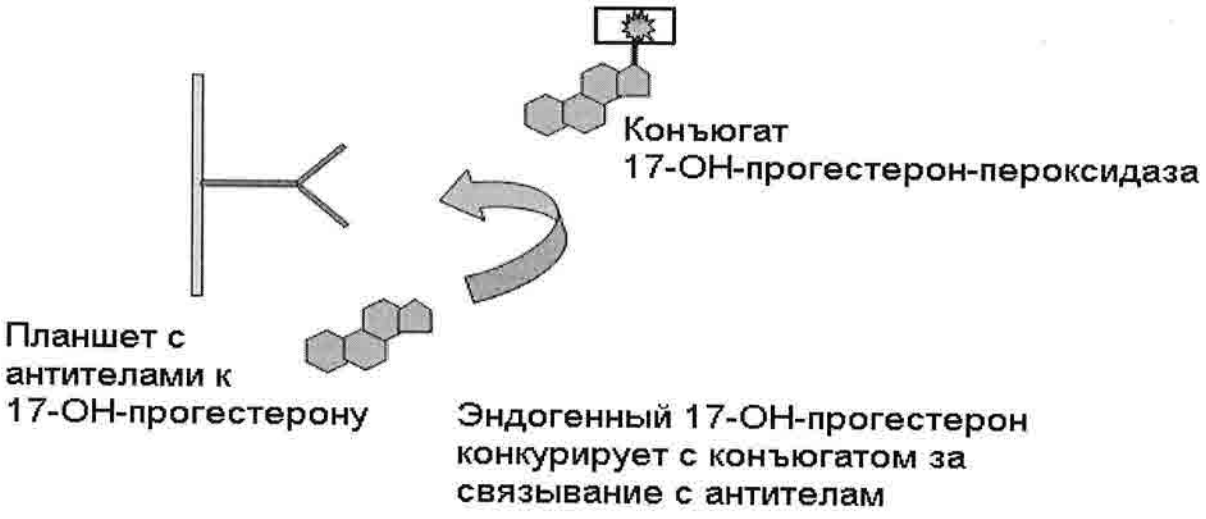


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации 17-ОН-прогестерона в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация 17-ОН-прогестерона в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок поликлональными антителами к 17-ОН-прогестерону,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

маркирован «Стрипы с поликлональными антителами к 17-ОН-прогестерону» — 1 упаковка;

- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества 17-ОН-прогестерона. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций 17-ОН-прогестерона в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 1; 2; 6; 10; 60 нмоль/л – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат 17-ОН-прогестерон-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (9 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» – 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием 17-ОН-прогестерона, маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к 17-ОН-прогестерону с другими стероидами приведена в Таблице 1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Стероид	Перекрестная реакция, %
С21-стероиды	
17-α-Гидроксипрогестерон	100
Прегненолон	0,008
17-Гидроксипрегненолон	0,626
17-Гидроксипрегненолона сульфат	0,586
Прогестерон	0,340
Дезоксикортикостерон	0,018
11-Дезоксикортизол	0,586
21-Дезоксикортизол	1,690
Кортикостерон	0,003
Альдостерон	<0,001
Кортизол	0,003
С19-стероиды	
Андростендион	0,002
Тестостерон	0,004
5-α-Дигидротестостерон	<0,001
ДГЭА	<0,001
ДГЭА-сульфат	<0,001
С18-стероиды	
17-β-Эстрадиол	<0,001
17-α-Эстрадиол	<0,001
Эстрон	<0,001
Эстриол	<0,001

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.2. Коэффициент вариации результатов определения 17-ОН-прогестерона в одном и том же образце сыворотки или плазмы крови человека с использованием набора «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации 17-ОН-прогестерона в анализируемых образцах при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» 17-ОН-прогестерона — проверка соответствия значения определяемой концентрации 17-ОН-прогестерона расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №4. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация 17-ОН-прогестерона в анализируемом образце не превышает 0,3 нмоль/л.

3.6. Диапазон ожидаемых значений. Содержание 17-ОН-прогестерона измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 120 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Концентрация 17-ОН-прогестерона в сыворотке крови женщин с нормальным менструальным циклом в фолликулиновой фазе составляет <0,3–2,06 нмоль/л, в лютеиновой фазе – 1,42-6,91 нмоль/л. Концентрация 17-ОН-прогестерона в сыворотке крови мужчин составляет 0,4-8,3 нмоль/л.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: *в наборе «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» значения концентраций калибровочных проб выражены в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл необходимо значение концентрации в нмоль/л умножить на 0,33.*

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт (соли ЭДТА или гепарина). После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку. Возможность использования других антикоагулянтов для набора «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» не установлена.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,75 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°С).

На странице 18 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 50 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: *общее время внесения калибровочных*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.3. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании **в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 650–800 об/мин**.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по **п. 7.1.4.**, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.7.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

Примечание: *максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: *среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

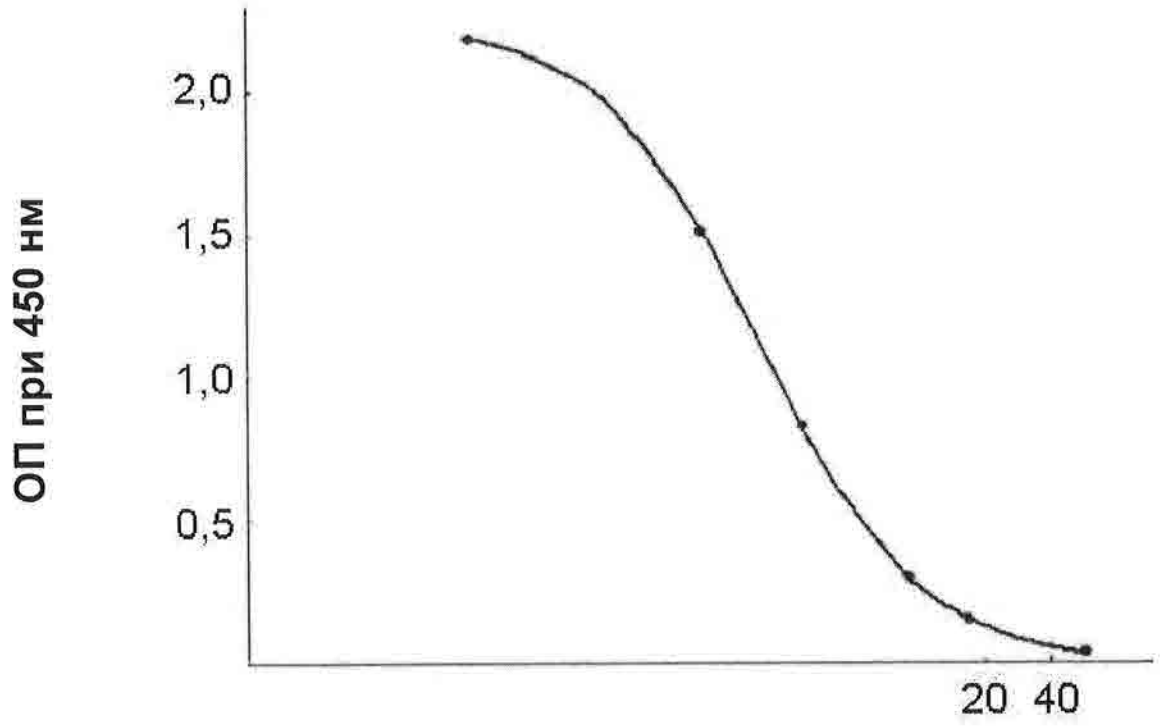
9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации 17-ОН-прогестерона (нмоль/л) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Для построения калибровочного графика рекомендуется использовать метод аппроксимации 4PL. Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание 1: *для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

Примечание 2: *для обнуления прибора используется среднее арифметическое значение оптической плотности в паре лунок №1.*

9.2. Определить содержание 17-ОН-прогестерона в пробах по калибровочному графику.



Log концентрации 17-ОН-прогестерона, нмоль/л

Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

9.3. Для образцов со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора принимать значение концентрации «ниже 0,3 нмоль/л».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации 17-ОН-прогестерона, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизованных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°С) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации 17-ОН-прогестерона в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Темпе-ратура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	***50 мкл*** КП и КС	**КТ** (+18… +25°С)	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15’	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		***50 мкл*** исследуемых образцов			
3		***50 мкл*** конъюгата			
4	**Инкубация**	—	**+37°С**	30’	Термостатируемый **шейкер**, 650-800 об/мин
5	Промывка	***300 мкл*** в лунку **1*промывочного раствора** (4 раза)			**1***промывочный раствор = =14 мл буфера Р + 266 мл H_2O
6	Внесение хромогена	***100 мкл*** **ТМБ**			
7	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	15 - 30’	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	***100 мкл*** **стоп-реагента**			
9	Перемешивание		**КТ**	1 - 2’	**Шейкер**
10	Регистрация результатов	—		В течение 20’ после остановки ферментной реакции	**Фотометр,** 450 нм
11	Обработка результатов				Соответствующее ПО

Примечания: *КП — калибровочная проба;*
КС — контрольная сыворотка;
ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°С);
ПО – программное обеспечение.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора «СтероидИФА-17-ОН-прогестерон» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А; тел./факс: (812) 677-8779.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru