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

Instruction for use

ХЕМА

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 17-ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

«17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF 17-OH-PROGESTERONE IN HUMAN SERUM OR PLASMA

17-OH-PROGESTERONE EIA

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ REF **K217**

ТУ № 9398-067-18619450-2008

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
№ ФСР2009/04164 от 4 сентября 2013 года

For 96 determinations/На 96 определений

IVD Для *ин витро* диагностики

CE EC REP

XEMA Co., Ltd.
The 9th Parkovaya str., 48
105264 Moscow, Russia
Tel./fax: +7(495) 510-57-07
e-mail: redkin@xema-medica.com
internet: www.xema-medica.com

Authorized Representative in EU:
Polmed.de
Steinacker 20, D-73773
Aichwald, Germany
e-mail: info@polmed.de

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

«УТВЕРЖДЕНА»
Приказ Росздравнадзора № 1199-Пр/09 от 17 февраля 2009 г.
КРД 59503 от 25.12.2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 17-ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации 17-гидроксипрогестерона в сыворотке и плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. 17-ОН-прогестерон (17-ОН-Р) – промежуточный продукт в биосинтезе глюкокортикоидов, эстрогенов и андрогенов с молекулярной массой 330 Да. 17-ОН-Р секретируется корой надпочечников, яичниками и семенниками посредством синтеза из прогестерона с помощью фермента 21-гидроксилазы. 17-ОН-Р вырабатывается яичниками во время фолликулярной фазы в небольшом количестве, после чего его концентрация немного увеличивается и остается постоянной до конца лютеиновой фазы. Уровень 17-ОН-Р уменьшается, если оплодотворения не произошло. В случае имплантации желтое тело продолжает секретировать 17-ОН-Р. В клинике анализ 17-ОН-Р важен для диагностики врожденной гиперплазии надпочечников, которая приводит к активации синтеза андрогенов и приводит к развитию адреногенитального синдрома (АГС). При АГС основной путь метаболизма стероидов блокируется из-за дефицита 21-гидроксилазы, в результате чего концентрация 17-ОН-Р возрастает в 5 и более раз. В зрелом возрасте при частично или поздно проявившемся дефиците фермента концентрация 17-ОН-Р может быть в норме или повышенной.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение 17-гидроксипрогестерона основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к 17-ОН-Прогестерону. 17-ОН-Прогестерон из образца конкурирует с конъюгированным 17-ОН-Прогестероном за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации 17-ОН-Прогестерона в исследуемом образце. Концентрацию 17-ОН-Прогестерона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания 17-ОН-Прогестерона в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция кроличьих поликлональных антител к 17-ОН-Р с другими аналитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
17-ОН-Р	100%
11-Дезоксикортизол	2.3%
Прогестерон	<1.0%
Другие родственные стероиды	<0.1%

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания 17-ОН-Прогестерона в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации 17-ОН-Прогестерона в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей 17-ОН-Прогестерон, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.5–100 нмоль/л и составляет ±10.0%.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации 17-ОН-Прогестерона предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1,5 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» концентрация 17-ОН-Прогестерона в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.12 нмоль/л.

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

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P217Z	SORB MTP	**Планшет** 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C217Z	CAL 1–6	**Калибровочные пробы** на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества 17-ОН-Прогестерона – **0**; **0.5**; **1.5**; **5**; **20**; **100 нмоль/л**, готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	6	шт.	прозрачные жидкости пурпурного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q217Z	CONTROL	**Контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием 17-ОН-Прогестерона, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T217Z	CONJ HRP	**Конъюгат**, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	**Раствор субстрата тетраметилбензидина** (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 26X	**Концентрат отмывочного раствора** (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	**Стоп-реагент**, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K217I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»	1	шт.	-
10	K217Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37 °С ±0.1 °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18…+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2…+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

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

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2…+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2…+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2…+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2…+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2…+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18…+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2…+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации 17-ОН-Прогестерона в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

8.9. Срок годности Набора 18 месяцев.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	**Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.** Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
3	**Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.**
4	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и **инкубируйте** его **в течение 90 минут при температуре +37 °С.**
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и **отмойте лунки 5 раз**. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
6	**Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина**. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. **Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25°С) в течение 10–20 минут** в зависимости от степени развития синего окрашивания.
7	**Внесите во все лунки** с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, **по 100 мкл стоп-реагента**, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
8	**Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета** на фотометре вертикального сканирования **при длине волны 450 нм**. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
9	Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – десятичный логарифм концентрации 17-ОН-Прогестерона в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например, 0.001 нмоль/л
10	Определите по калибровочному графику содержание 17-ОН-Прогестерона в исследуемых образцах.

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

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций 17-ОН-Прогестерона в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.12 нмоль/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (100 нмоль/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация 17-ОН-Прогестерона ниже 0.12 нмоль/л или выше 100 нмоль/л.

10.2. В Наборе «17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в нмоль/л следует умножить на 0.32.

1 нмоль/л = 0.32 нг/мл

Исследуемая группа	Единицы, нмоль/л		Единицы доп., нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
новорожденные	0.7	2.3	0.23	0.75
дети	0.1	2.7	0.03	0.89
Мужчины				
пубертат	0.2	5.3	0.07	1.74
постпубертат	0.9	6.0	0.30	1.97
Женщины				
пубертат	0.1	7.0	0.03	2.30
постпубертат	0.2	8.7	0.07	2.85
Беременные:	2.0	12	0.66	3.93
Фазы цикла:				
фолликулярная	0.2	2.4	0.07	0.79
лютеиновая	0.9	8.7	0.30	2.85
менопауза	0.12	7.0	0.04	2.30

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17- hydroxyprogesterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:42, 1971
2. Chrousos, G.P., D. L. Loriaux, D.L. Mann, et al: Late onset 21- hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic avarian disease. Annals Intern. Med. 96:143, 1982.
3. Buster, J.E., R.J. Chang, D.L. Preston, et al: Interrelationships of circulating maternal steroids; progesterone, 16ahydroxyprogesterone, 17a-hydroxyprogesterone, 20a-dihydroprogesterone, gamma-5-pregnolonone, gamma-5-pregnolonone-sulfate, gamma-5-pregnolone-sulfate and 17-hydroxy gamma-5-pregnolonone, J. Clin. Endocrinol. Metab. 48:133, 1979.
4. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. Recent Progress in Hormone Research, 37:105, 1981.
5. Pang S., J. Hotchkiss, A. Drash, et al: Micro filter paper method for 17ahydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45:1003, 1977.
6. Lobo, R.A., U. Goebelsmann: Adult manifestation of congenital adrenal hyperplasia due to incomplete 21-hydroxylase deficiency mimicking polycystic ovarian disease. Am. J. Obstet. Gynecol., 138:720, 1980.
7. Urban, M.D., P.A. Lee and C.J. Migeon: Adult high infertility in men with congenital adrenalized hyperplasia. N. Engl. J. Med. 299:1392, 1978.
8. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. Fertil. Steril. 41:575, 1984

По вопросам, касающимся качества Набора **«17-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, г. Москва, а/я 58
105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,
тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин