

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От \_\_\_\_\_ 200 г. № \_\_\_\_\_

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для количественного определения

17 $\alpha$  - ОН - прогестерона в сыворотке или плазме крови человека

методом иммуноферментного анализа

**(ИФА-17-ОН-ПГ)**

Рекомендована Научно-экспертным Советом по медицинским

изделиям

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор ИФА-17-ОН-ПГ предназначен для количественного определения 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерона (17-ОН-ПГ) в сыворотке или плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемого образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений.

Количественное определение содержания 17-ОН-ПГ в крови человека используется в клинической практике для диагностики аденогенитального синдрома и для оценки функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

---

Инструкция составлена: зав. производственным отделом ООО НПФ «Литех» при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, к.м.н. Плаховым И.В., зам. директора ООО НПФ «Литех» при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, д.б.н. Говоруном В.М.

## 2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение основано на одностадийном варианте твердофазного иммуноферментного анализа, при котором происходит конкуренция 17-ОН-ПГ в анализируемом образце с 17-ОН-ПГ, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат), за связывание с моноклональными антителами к 17-ОН-ПГ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляются во время отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс выявляется ферментативной реакцией при добавлении субстрата (тетраметилбензидина). Интенсивность окраски продукта окисления субстрата обратно пропорциональна содержанию 17-ОН-ПГ в анализируемой пробе.

## 3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сорбированный мышиными моноклональными IgG-антителами к 17-ОН-ПГ - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества 17-ОН-ПГ: 0 нг/мл (1,0 мл); 0,2; 0,4; 1,6; 6,4; 19,2 нг/мл ( по 0,8 мл); концентрации 17-ОН-ПГ в калибровочных пробах могут незначительно изменяться от указанных величин, точные значения указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 пробирок;
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием 17-ОН-ПГ, готовая для использования - 1 пробирка (0,6 мл);
- конъюгат 17-ОН-ПГ с пероксидазой, готовый для использования - 1 флакон (6,0 мл);
- отмывочный раствор: фосфатно-солевой буфер с 0,05% твин-20, pH 7,2-7,4, 20-кратный концентрат – 1 флакон (50,0 мл);
- раствор хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 11-кратный концентрат – 1 пробирка (1,5 мл);
- субстратный буфер, содержащий перекись водорода, pH 4,6-4,8 – 1 флакон (15,0 мл);
- стоп-реагент (кислота серная, 1 М), готовый для использования – 1 флакон (15,0 мл).

## 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Неспецифические реакции с родственными соединениями составляют: для 17 $\alpha$ -ОН-прегненолона – 1,3%, прогестерона – 1,2%, кортизола – 0,02%, холестерина – 0,0008%.

4.2 Чувствительность. Минимальная концентрация 17-ОН-ПГ, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,05 нг/мл.

4.3. Воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации результатов определения концентрации 17-ОН-ПГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови не превышает 8%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» 17-ОН-ПГ - соответствие измеренной концентрации 17-ОН-ПГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,4 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Линейность. Зависимость концентрации 17-ОН-ПГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей 17-ОН-ПГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,2-19,2 нг/мл и составляет 90-110%.

4.6. Клиническая проверка. Содержание 17-ОН-ПГ измеряли в сыворотке (плазме) крови, взятой с 9 до 11 часов, у 25 здоровых мужчин в возрасте 20-42 лет, 115 здоровых женщин в возрасте 18-37 лет в различных фазах менструального цикла, 14 женщин в возрасте 44- 51 лет в менопаузе, 24 беременных женщин, 16 новорожденных и 12 здоровых детей в возрасте 1-12 лет. Средние концентрации 17-ОН-ПГ в сыворотке (плазме) крови указаны в нижеприведенной таблице.

| Возрастная группа       | Единицы СИ                          |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Женщины:                |                                     |
| Фолликулиновая фаза     | 0,6-3,6 нмоль/л (0,2-1,2 нг/мл)     |
| Лютеиновая фаза         | 3,1-9,4 нмоль/л (1,0-3,1 нг/мл)     |
| Менопауза               | 0,6-3,9 нмоль/л (0,2-1,3 нг/мл)     |
| Беременные:             |                                     |
| 1 триместр              | 4,0-9,0 нмоль/л (1,3-3,0 нг/мл)     |
| 2 триместр              | 6,0-15,0 нмоль/л (2,0-5,0 нг/мл)    |
| 3 триместр              | 15,0-25,0 нмоль/л (5,0-8,3 нг/мл)   |
| Мужчины                 | 1,5-7,2 нмоль/л (0,5-2,4 нг/мл)     |
| Новорожденные (1-2 дня) | 30,0-100,0 нмоль/л (9,9-33,0 нг/мл) |
| Дети (1-12 лет)         | 0,2-3,7 нмоль/л (0,07-1,2 нг/мл)    |

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора реагентов 17-ОН-ПГ уточнить значения концентраций 17-ОН-ПГ, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента.

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

5.2 Все компоненты набора, за исключением серной кислоты, в используемых концентрациях являются нетоксичными. Серная кислота действует на кожу и слизистые

прижигающим образом, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы ее следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

5.3 Тетраметилбензидин (ТМБ), субстратный буфер и рабочий раствор ТМБ чувствительны к воздействию солнечного света; необходимо также исключить их контакт с окислителями и металлами.

5.4 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.).

5.5 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и другие возбудители вирусных инфекций.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру  $+37^{\circ}\text{C}$ , или планшетный шейкер-термостат на температуру  $+37^{\circ}\text{C}$ ;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100-300 мкл;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

## 7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка (плазма) крови человека.

До проведения анализа возможно хранение образцов сыворотки (плазмы) крови при температуре  $+(2 - 8)^{\circ}\text{C}$  не более 2 дней или в замороженном состоянии при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  (и ниже) не более 3 месяцев. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов сыворотки (плазмы) крови.

## 8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

8.1. Приготовление рабочего отмывочного раствора. Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего раствора – 1 месяц при температуре +2 - +8°C.

*Для анализа четырех стрипов: 16 мл концентрата довести до 320 мл дистиллированной водой.*

8.2. Приготовление рабочего раствора ТМБ. Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

*Для анализа четырех стрипов: 0,4 мл концентрата ТМБ смешать с 4 мл субстратного буфера.*

8.3. Калибровочные пробы, контрольная сыворотка, конъюгат 17-ОН-ПГ-пероксидаза, стоп-реагент готовы к использованию.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1 Выдержать компоненты набора и анализируемые образцы крови при комнатной температуре +(18-25)° С не менее 30 минут. Пакет с планшетом не открывать! Встряхнуть все компоненты набора.

9.2 Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество образцов + 6 калибровочных проб + 1 контрольная сыворотка + Blank) x 2. Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с осушителем должен оставаться внутри). Хранить при температуре +(2-8)° С не более 3 месяцев.

9.3 Внести в соответствующие лунки (в дубликатах) по 50 мкл каждой калибровочной пробы (начиная с минимальной концентрации), контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4 Внести во все лунки, кроме Blank, по 50 мкл конъюгата. Конъюгат вносить в лунки планшета в той же последовательности, что и калибровочные пробы, контрольную сыворотку и исследуемые образцы. Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых образцов и конъюгата не должно превышать 10 минут.

9.5 Заклеить планшет липкой лентой. Осторожно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 секунд и инкубировать в течение 60 минут при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ .

9.6 Содержимое лунок удалить декантированием и затем промыть лунки планшета 5 раз рабочим отмывочным раствором (см п. 8.1), внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.7 Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ в той же последовательности, что и конъюгат.

9.8 Инкубировать планшет в темном месте при комнатной температуре ( $+18-25^{\circ}\text{C}$ ) в течение 15 - 20 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9 Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента. Тщательно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 секунд.

9.10 Провести измерение величины оптической плотности в лунках планшета на фотометре при длине волны 450 нм. Длительность процедуры измерения оптической плотности не должна превышать 15 минут (до измерения хранить планшет в защищенном от солнечного света месте).

## 10. РАСЧЕТЫ

10.1 Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось Y) от концентрации 17-ОН-ПГ в калибровочных пробах (ось X).

10.2 Рассчитать средние арифметические значения показателей оптической плотности контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови и по калибровочному графику определить концентрацию 17-ОН-ПГ.

10.3 При построении калибровочного графика и определении концентрации 17-ОН-ПГ в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора иммуноферментных реакций рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.

10.4 Для выражения концентрации 17-ОН-ПГ в нмоль/л значения, полученные в нг/мл, следует разделить на коэффициент 3,03.

## 11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.

11.1 Набор реагентов ИФА-17-ОН-ПГ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение

набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  не более 3 суток.

11.2 Срок годности набора – 1 год.

11.3 В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытый планшет можно хранить в плотно закрытом пакете с осушителем при температуре  $+ (2-8)^{\circ}\text{C}$  не более 3 месяцев;
- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, конъюгат, раствор ТМБ и субстратный буфер после вскрытия флаконов можно хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  не более 2 месяцев;
- рабочий отмывочный раствор можно хранить в закрытой емкости при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- рабочий раствор ТМБ хранению не подлежит;
- стоп-реагент можно хранить в закрытой емкости при комнатной температуре в течение всего срока годности.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме того, рекомендуется определение 17-ОН-ПГ в контрольной сыворотке.

11.5. Не допускается использование раствора ТМБ и стоп-реагента из наборов других фирм-производителей.

11.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора ИФА-17-ОН-ПГ, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, телефон/факс: (495)246-45-01, или (e.mail) [info@lytech.ru](mailto:info@lytech.ru)

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (095)120-60-95; 120-60-96.

Директор ООО НПФ «Литех»



ГОВОРУН Т.Л.