



RH-351



96



## **ИНСТРУКЦИЯ** **по применению набора реагентов** **«ДС-ИФА-Стероид-Прогестерон»** **Тест-система иммуноферментная для количественного** **определения прогестерона**

### **1. Назначение**

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Стероид-Прогестерон» предназначен для количественного определения содержания прогестерона в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Прогестерон или гормон желтого тела синтезируется в яичниках и в плаценте при беременности. Он помогает сохранению беременности, подготавливает внутреннюю слизистую оболочку матки для имплантации в нее оплодотворенной яйцеклетки, подавляет действие эстрогенов и сокращение матки, способствует развитию железистой ткани молочных желез. Разрушается прогестерон в печени и выводится с мочой. Количественное определение уровня прогестерона в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния желтого тела, наблюдении за протеканием беременности и может проводиться в исследовательских целях.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке.

### **2. Характеристика набора**

#### **2.1. Принцип действия.**

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата прогестерон-пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного прогестерона и прогестерона, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к прогестерону, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами прогестерона и конъюгата прогестерон-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально концентрации прогестерона в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата прогестерон-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация прогестерона в исследуемых образцах.

## 2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Стероид-Прогестерон»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент – 96-луночный разборный полистироловый планшет (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к прогестерону.	1 шт
Конъюгат – прогестерон, меченный пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества прогестерона. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций прогестерона в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов. В качестве консервантов содержат: 0,1% проклин 300, 0,1% фенол.	6 флаконов по 0,5 мл
Контрольная сыворотка – на основе сыворотки крови человека с известным содержанием прогестерона. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат x 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор – прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М – серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой.	1 шт
Инструкция по применению.	1 шт

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным разборным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники к полуавтоматическим пипеткам;
- пластиковая ванночка для реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

### 3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация прогестерона в сыворотке крови человека не превышает 0,5 нмоль/л.

3.2. Специфичность. Величины перекрестных реакций с родственными соединениями приведены в таблице 2.

Таблица 2

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
прогестерон	100
тестостерон	0,01
эстрадиол	0,004
кортизон	0,041
кортизол	0,005
кортикостерон	0,1
дегидротестостерон	0,041
андростендион	0,1
17-ОН-прогестерон	2,9
прегнандион	10

3.3. Коэффициент вариации результатов определения прогестерона в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации прогестерона имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 1 - № 5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» прогестерона – соответствие измеренной концентрации прогестерона предписанной в пробе, полученной смешением равных объемов контрольной сыворотки и «Калибратора 2». Процент открытия составляет 90-110%.

- 3.6. Клиническая проверка. Концентрацию прогестерона измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч:
- у 100 здоровых людей в возрасте от 21 до 45 лет. Концентрация прогестерона в сыворотке крови 50 здоровых мужчин составила от 0,5 до 5,2 нмоль/л. Концентрация прогестерона в сыворотке крови женщин с нормальным менструальным циклом в фолликулярной фазе составляет от 0,5 до 6,5 нмоль/л, в лютеиновой фазе от 8 до 87 нмоль/л;
  - у 1058 женщин с нормально протекающей беременностью. Концентрация прогестерона в сыворотке крови беременных на разных сроках составила:

Триместр (недели)	Нмоль/л
I (1-12)	10-182
II (13-24)	60-332
III (25-40)	185-960

Правила пересчета результатов:

$$\text{нмоль/л} \times 0,314 = \text{нг/мл}; \text{нг/мл} \times 3,18 = \text{нмоль/л}.$$

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций прогестерона, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента лиц.

#### 4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- 4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- 4.2. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
  - неспецифических компонентов (ПР (концентрат x 25), ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».
- 4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- 4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- 4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгата.
- 4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- 4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.
- 4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.
- 4.9. Промывка лунок – важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- 4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.
- 4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.
- 4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- 4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

#### 5. Инструкции по безопасности

- 5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- 5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении калибраторов и контрольной сыворотки, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), р24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.
- 5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- 5.4. Нельзя пипетировать ртом.
- 5.5. При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- 5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.
- 5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реактанта с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы, или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кг/см<sup>2</sup> (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кг/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

5.11. Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% – раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

## 6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание планшета при температуре (37,0 ± 0,5) °С со скоростью от 500 до 800 об/мин;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные 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;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндры мерные вместимостью 200 мл и 500 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## 7. Подготовка исследуемых образцов сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов сыворотки крови с добавлением азид натрия в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток или при температуре минус 20 °С и ниже не более 3 месяцев (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией анализировать нельзя! Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 минут при температуре от 2 до 8 °С.

## 8. Подготовка реагентов для анализа

Перед использованием все реагенты набора и анализируемые образцы сыворотки крови выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8.1. Иммуносорбент. **Внимание: Во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и переставить на рамку необходимое количество стрипов.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

8.2. Приготовление рабочего промывочного раствора. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

8.3. Конъюгат, калибровочные пробы, контрольная сыворотка, ТМБ-Субстратный раствор и стоп-реагент готовы к применению.

## 9. Проведение анализа

9.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

9.2. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки в двух повторах внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови.

**Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!**

9.3. Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, закрыть планшет крышкой или защитной пленкой.

9.4. Возможны две процедуры инкубации планшета:

**Процедура 1 (термостатируемый шейкер,  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ ):**

Планшет инкубировать в течение 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

**Процедура 2 (комнатная температура):**

После внесения в лунки планшета образцов и конъюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре (здесь  $20-25 ^\circ\text{C}$ ).

9.5. По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР (см.п.8.2.), добавляя во все лунки планшета не менее 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.6. Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать 20-30 мин при комнатной температуре в темноте.

**Процедура 1:** 20-30 мин.

**Процедура 2:** 20-30 мин.

9.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ-Субстратный раствор, по 150 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхнуть планшет на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

9.8. **Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-Стероид-Прогестерон» на автоматических ИФА-анализаторах.** Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,500.

## 10. Регистрация результатов

Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм.

## 11. Учёт результатов

Для обсчета результатов также возможно использовать построенный в системе координат “Logit-Log” график зависимости Logit (B/B0) от логарифма (LN) концентрации прогестерона в калибровочных пробах, где B – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, B0 – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0. Logit (B/B0) рассчитывается как  $\text{LN}((1-B/B0)/(B/B0))$ .

Определение концентрации прогестерона в контрольной сыворотке необходимо для проверки точности и достоверности полученных результатов. В том случае, когда полученное значение концентрации в контрольной сыворотке находится в пределах концентраций, указанных на этикетке флакона с контрольной сывороткой, полученные при анализе исследуемых проб результаты являются достоверными.

## 12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для количественного определения содержания прогестерона в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения прогестерона в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

12.2. При использовании двух и более планшетов, рекомендуется ставить калибровочные пробы при каждой постановке.

12.3. Нельзя касаться дна лунок.

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

12.5. Гетерофильные антитела к белкам мыши или другим животным белкам могут повлиять на данный анализ.

### 13. Условия хранения в эксплуатации набора

13.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности указан на упаковке набора.

13.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.











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

- Иммуносорбент – оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в герметично закрытый пакет и хранить при температуре от 2 до 8 °С на протяжении срока годности набора;
- ПР, 25-кратный концентрат и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытом виде при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора;
- Рабочий ПР, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С;
- Конъюгат, калибровочные пробы, контрольную сыворотку и ТМБ-субстратный раствор после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытом виде при температуре от 2 до 8 °С не более 2 месяцев.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам качества набора следует обращаться в ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» по адресу: 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300. E-mail: info@npods.ru, www.npods.ru.

### 14. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)		Номер партии (серии)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)		Температурные пределы хранения
	Производитель		Срок годности число/месяц/год
	Каталожный номер		Использовать инструкцию по применению
	Количество определений		Содержит раздражающее вещество

### Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013

- «Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности»».
- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».
- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».



- «Внимание», символ 5.4.4;



- Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.4;



- Беречь от влаги, символ 5.3.2.

### 15. Список литературы

1. Buster, J.E., R.J. Chang, D.L. Preston, et al: Interrelationships of circulating maternal steroids; progesterone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, gamma-5-pregnenolone, gamma-5-pregnenolone-sulfate, gamma-5-pregnenolone-sulfate and 17-hydroxy gamma-5-pregnenolone, J. Clin. Endocrinol. Metab. 48:133, 1979.
2. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.
3. Matthews C.P., et al.: Obstet. Gynecol., 68:390, 1986.

**Методы математической обработки результатов**

При учете результатов с помощью встроенного или внешнего программного обеспечения спектрофотометра рекомендуется использовать следующие методы математической обработки результатов:

<b>Марка спектрофотометра</b>	<b>Рекомендуемые методы математической обработки</b>
Statfax 2100, 3200	Linear regression в координатах Logit-Log
Tecan Sunrise	4 parameter Marquardt
Bio-Rad 680	4 PL-Cook-Wilkenson
Multiscan EX	Не рекомендуется автоматический расчет концентраций на ридере
Multiscan FC	4 parameters logistic

## СХЕМА АНАЛИЗА

<b>1</b>	<b>Внести</b>	По 25 мкл калибраторов и контрольной сыворотки в двух повторах; По 25 мкл исследуемых сывороток в двух повторах	
<b>2</b>	<b>Внести</b>	По 100 мкл конъюгата во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора	
<b>3</b>	<b>Инкубировать</b>	<b>Процедура 1</b> 30 мин, шейкер, 37 °С	<b>Процедура 2</b> 90 мин, комнатная температура
<b>4</b>	<b>Промыть планшет</b>	5 раз, не менее 300 мкл рабочего промывочного раствора	
<b>5</b>	<b>Внести</b>	По 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора во все лунки	
<b>6</b>	<b>Инкубировать</b>	20-30 мин, в темноте	
<b>7</b>	<b>Внести</b>	По 150 мкл стоп-реагента	
<b>8</b>	<b>Встряхнуть</b>	В течение 5-10 секунд	
<b>9</b>	<b>Учет результатов</b>	450 нм	

нмоль/л x 0,314 = нг/мл; нг/мл x 3,18 = нмоль