



## Імуноферментний набір для кількісного визначення 17- $\alpha$ -ОН-ПРОГЕСТЕРОНУ

**Кат. №** : 102-1292  
**Кількість аналізів** : 96  
**Виробник** : DRG (Німеччина)

Методика від 02-2008  
Версія 7.0

**Увага:** основою для проведення аналізу є оригінал інструкції англ. мовою.

### 1. ВСТУП

Імуноферментний набір компанії DRG містить матеріали для кількісного визначення 17- $\alpha$ -ОН-прогестерону в сироватці. Аналіз призначений тільки для застосування в діагностиці *in vitro*.

#### 1.2 Короткий опис і пояснення

Стероїд 17- $\alpha$ -ОН-Прогестерон (17- $\alpha$ -ОНП) секретується як наднирниками, так і гонадами. Хоч він і має незначну прогестеронову активність, клінічне значення його надзвичайно велике, оскільки він є безпосереднім попередником 11-дезоксикортизолу. Так як 11-дезоксикортизол синтезується через 21-гідроксилування 17- $\alpha$ -ОНП, визначення 17- $\alpha$ -ОНП є непрямим ознакою активності 21-гідроксилази. При спадковій недостатності 21-гідроксилази формується зв'язку з надлишком синтезу 17- $\alpha$ -ОНП вроджена адренальна гіперплазія. Також він помірно підвищений при недостатності 11- $\beta$ -гідроксилази. Вимірювання 17- $\alpha$ -ОНП, таким чином, є цінним методом діагностування вродженої адренальної гіперплазії.

#### 1.3 Клінічна фізіологія

##### Дорослі невагітні жінки

У дорослих невагітних жінок дитородного віку концентрація 17- $\alpha$ -ОНП протягом менструального циклу, зростаючи у лютеальну та знижуючись у фолікулярну фази. Це зв'язано з тим, що 17- $\alpha$ -ОНП секретується паралельно з прогестероном дозрілими фолікулами або жовтим тілом. Існує також добова циркадна варіабельність концентрації 17- $\alpha$ -ОНП. Його секреція здійснюється паралельно з кортизолом і сягає максимуму між північчю і 8.00 ранку.

##### Дорослі чоловіки

Поки що є мало інформації щодо варіабельності концентрації 17- $\alpha$ -ОНП у дорослих чоловіків.

##### Вагітні жінки та новонароджені

Стероїд 17- $\alpha$ -ОНП продукується у великій кількості плодом і наднирниковими залозами. Він секретується як в кровообіг плода, так і матері. Концентрація 17- $\alpha$ -ОНП в крові матері зростає різко після 32 тижня гестації і сягає в цей період в 4 рази більше базального рівня.

#### 1.4 КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

##### Вроджена адренальна гіперплазія

Визначення 17- $\alpha$ -ОНП застосовується в діагностиці вродженої адренальної гіперплазії у новонароджених з невизначеними геніталіями і у дівчаток з вірильністю. Оскільки 17- $\alpha$ -ОНП є попередником 11-дезоксикортизолу, базальна концентрація 17- $\alpha$ -ОНП значно підвищена у пацієнтів з недостатністю 21-гідроксилази і в меншій мірі - з недостатністю 11- $\beta$ -гідроксилази. Так як 17- $\alpha$ -ОНП значно зростає у новонароджених та дівчаток з вродженою наднирковою недостатністю, для постановки діагнозу часто буває достатнім одне вимірювання 17- $\alpha$ -ОНП.

##### Пізній початок адренальної гіперплазії

Також, вимірювання концентрації 17- $\alpha$ -ОНП проводиться у андрогенізованих жінок, коли підозрюється пізній початок функціонування 21-гідроксилази. Цей стан клінічно дуже важкий для діагностики і так як картина така сама, як при класичному полікістозі яєчників, концентрації 17- $\alpha$ -ОНП на відміну від класичної вродженої адренальної гіперплазії, залишаються нормальними. Діагностування проводять шляхом проведення тесту стимуляції АКТГ.

##### Інше застосування

Вимірювання концентрації 17- $\alpha$ -ОНП застосовують у жінок та чоловіків при акне вульгаріс, облісінні чоловіків і деяких неясних формах безпліддя. Досвід щодо такого застосування дуже обмежений.

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір базується на принципі конкурентного зв'язування.

Невідома кількість 17- $\alpha$ -ОНП, присутня у зразку, і фіксована його кількість, кон'югована з пероксидазою хрому, конкурують за зв'язування з поліклональною анти-17- $\alpha$ -ОНП-сироваткою, що покриває дно лунок. Після інкубації планшетка промивається, щоб зупинити реакцію зв'язування. Після додавання субстрату визначається концентрації 17- $\alpha$ -ОНП, яка обернено пропорційна вимірній оптичній густині.

#### 3. ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- 1) Тільки для діагностичного використання "in vitro".
- 2) Для одержання інформації щодо шкідливої дії складових тесту звертайтеся до Material Safety Data Sheets.
- 3) Методів, які б з достаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- 4) Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
- 5) Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту зі шкірою і слизовими оболонками.

- 6) НЕ курити, не їсти і не використовувати косметику у місця проведення аналізу.
- 7) При роботі з реагентами і зразками використовуйте одноразові рукавички. Мікробіологічне забруднення реагентів і зразків може дати неправильні результати.
- 8) Робота повинна проводитися згідно установлених правил щодо безпеки.
- 9) Не використовувати тест після дати придатності, вказаної на упаковці.
- 10) Всі об'єми потрібно вносити згідно інструкції. Оптимальні результати можна одержати тільки при використанні каліброваних піпеток і мікро планшетного рідера.
- 11) Не змішуйте реагенти різних лотів наборів. Не змішуйте лунки планшета при проведенні аналізу. Тести могли перевозитися і зберігатися при різних умовах, а тому спільні ознаки і характеристики планшетів різних тестів можуть давати дещо різні результати.
- 12) Хімічні складові і приготовлені або використовувані реагенти треба використовувати і вважати небезпечними, а при їхньому знищенні слід керуватися національними вказівками і регулюванням по безпеці.

#### 4. КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

##### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікропланшетка з лунками:** 1шт., 96 лунок, покритих анти-17- $\alpha$ -ОНП-сироваткою.
2. **Набір стандартів (0-6): 7 флаконів;** 1,0 мл на флакон:  
Концентрації: 0,15; 0,5; 1,5; 3; 7,5; 20 нг/мл  
0; 0,45; 1,5; 4,5; 9,1; 22,7; 60,6 нмоль/л. Готові до використання.
3. **Ферментний кон'югат,** 1 фл., 25 мл. 17- $\alpha$ -ОНП, кон'югований з пероксидазою хрому. Готові до використання.  
\*містить Проклін 300 0,3 %, BND 0.015 % та MIT 0,010% в якості консервантів.
4. **Розчин Субстрату:** TMB, 1 фл., 25 мл.
5. **Стоп-розчин:** 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 фл., 25 мл. Уникайте контакту. Може визвати подразнення та опіки.
6. **Мийний розчин, 40 х,** 30 мл.  
\*BND = 5-бromo-5-нітро-1,3-діоксан  
MIT = 2-метил-2Н-ізотіазол-3-один

**Примітка:** Додатково Стандарт 0 для розведення зразків наявний за вимогою.

##### МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ.

1. Фотометр (450 нм $\pm$ 10 нм).
2. Мікропіпетки 100 і 200 мкл.
3. Абсорбуючий папір.
4. Дистильована вода.
5. Напів-логірифічний графічний папір

##### 4.2 Зберігання та стабільність набору

При зберіганні при температурі 2-8 $^{\circ}$ C активність реагентів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати. Планшетка з лунками повинна зберігатися при 2-8 $^{\circ}$ C. Після відкриття ящика треба знову тісно його запечатати. Імунореактивність лунок стабільна приблизно 6 тижнів після відкриття, але наступного тісного запечатування з десікантом.

##### 4.4 Приготування реагентів

Всі реагенти і необхідну кількість стрипів приведіть до кімнатної температури.

##### Промивний розчин

Додайте деіонізованої води 1170 мл до концентрованою Мийного розчину (вміст: 30 мл) до кінцевого об'єму 1200 мл. Розведений Мийний розчин стабільний при кімнатній температурі 2 тижні.

#### 5. ЗРАЗКИ

В аналізі можна використовувати сироватку.

Не використовувати гемолізовані, істеричні чи ліпемічні зразки.

**Зауважте:** зразки з азидом натрію не повинні використовуватись.

##### 5.1 Забір зразків

###### Сироватка:

1. Збирайте кров, пунктуючи вену; дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не потрібно ніякої попередньої обробки зразків. Пацієнтам, котрі проходять антикоагуляційну терапію треба давати довший період для зсідання крові.

##### 5.2 Зберігання зразків:

Зразки можуть зберігатися при 2-8 $^{\circ}$ C 24 години. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20 $^{\circ}$ C чи нижче. Заморожені зразки слід декілька разів перевернути перед використанням.

##### 5.3 Розбавлення зразків:

Зразки, у яких передбачається концентрація більша ніж у найвищому стандарті, повинні бути розведені Нульовим стандартом і провести аналіз це раз згідно Процедури Аналізу.  
Наприклад:  
А) розведення 1:10 – 10 мкл Виворотки + 90 мкл Нульового Стандарту (повністю перемішати)  
Б) розведення 1:100 – 10 мкл розведення А) 1:10 + 90 мкл Нульового Стандарту (повністю перемішати)

#### 6. ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

##### 6.1 Загальні зауваження

Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.

1. Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.

- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням. При піпетування Субстрату та Стоп-розчину уникайте піпеток з металевими частинами.
- Піпетуйте зразки і стандарти на дно лунок. При піпетування коньюгату і Стоп-розчину рекомендується тримати піпетку у вертикальному положенні над лункою і піпетувати відповідну кількість в центр лунки, щоб досягнути повного змішування.
- Інкубація – це функція інкубаційного часу і температури. Перед початком аналізу рекомендується приготувати всі реагенти і складові аналізу. Це зекономить час проведення аналізу без перерви.
- За загальним правилом ферментативна реакція лінійно пропорційна часу і температурі інкубації.

## 6.2 ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

Для кожного аналізу слід будувати стандартну криву.

- Відділіть необхідну кількість лунок;
- Додайте **25 мкл** Стандарту, Контролю і зразків у відповідні лунки чистими наконечниками;
- Інкубуйте **5 хвилин** при кімнатній температурі;
- Додайте **200 мкл** Ферментного коньюгату в кожен лунку;
- Добре змішайте планшетку протягом 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування розчинів на цьому етапі;
- Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі;
- Різно вилийте вміст лунок; Промийте лунки тричі розведеним Мийним розчином (400 мкл на лунку). Промокніть лунки на промокальному папері, щоб видалити залишки; Важливо правильно провести промивання.
- Додайте **200 мкл** Субстрату в кожен лунку за фіксовані часові інтервали;
- Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі;
- Зупиніть реакцію додаванням в кожен лунку **100 мкл** Стоп-розчину.
- Зчитайте дані на фотометрі при  $450 \pm 10$  нм впродовж **10 хвилин** після додавання Стоп-розчину.

## 6.3 Вирахування результатів

- Вирахуйте середні значення оптичної густини для кожного набору стандартів, контролів і зразків пацієнта
- Побудуйте стандартну криву відкладаючи значення оптичної густини, одержані з кожного стандарту по вертикалі, навпроти їхньої концентрації по горизонталі.
- Використовуючи середні значення оптичної густини для кожного зразка вчисліть відповідні концентрації з стандартної кривої.
- Автоматичний метод: Результати в IFU були автоматично вчислені використовуючи 4-х параметрову криву.
- Концентрацію зразка можна зчитати прямо із стандартної кривої. Зразки концентрацією більше ніж найвищий стандарт, треба розвести. Для обчислення концентрації, слід взяти до уваги фактор поділу.

### 6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані тільки для демонстрації і не можуть використовуватись при тестуванні.

Стандарт	Оптичні одиниці
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1,89
Стандарт 1 (0,15 нг/мл)	1,51
Стандарт 2 (0,5 нг/мл)	1,1
Стандарт 3 (1,5 нг/мл)	0,69
Стандарт 4 (3,0 нг/мл)	0,46
Стандарт 5 (7,5 нг/мл)	0,28
Стандарт 6 (20 нг/мл)	0,18

## 7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується для кожної лабораторії встановити свої нормальні значення.

Новонароджені	Дівчатка (нг/мл)	Хлопчики (нг/мл)	Дівчатка та хлопчики (нг/мл)
1 міс. віку	2,4-16,8	0,0-8,0	0-16,8
2 міс. віку	1,6-9,7	3,6-13,7	1,9-9,8
3 міс. віку	0,1-3,1	1,7-4,0	0,1-4,0

Діти	3-14 років	0,07-1,7
Жінки репродуктивного віку (фази):	фолікулярна	0,1-0,8
	лютеальна	0,6-2,3
	овуляція	0,3-1,4
	після АКТГ	< 3,2
	3 триместр	2,0-12
Здорові чоловіки	постменопауза	0,13-0,51
		0,5-2,1

## 8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно державних і федеральних правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

## 9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

### 9.1 Динамічний діапазон аналізу

Динамічний діапазон аналізу: 0 – 20 нг/мл

## 9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність:

Стероїд	% перехресної реактивності
17- $\alpha$ -ОН Прогестерон	100,0
Естріол	менше 0,01
Естрадіол 17 $\beta$	менше 0,01
Тестостерон	менше 0,01
Дигідротестостерон	менше 0,01
ДОС	0,05
11-Дезоксикортизол	1,4
Прогестерон	1,2
DHEA	менше 0,01
DHEAS	менше 0,001
Кортизол	менше 0,01
Кортикостерон	менше 0,05
Альдостерон	менше 0,01
Андростендіон	менше 0,01
Дигідроепіандростен-сульфат	менше 0,01
Преднізон	менше 0,01

## 9.3 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість була обчислена : середня мінус два стандартних відхилення з двадцяти (20) реплікацій цих аналізів Нульового Стандартну і становить 0,034 нг/мл.

## 9.4 Точність

### 9.4.1 Точність в межах аналізу

Зразок	n	Середнє нг/мл	КВ, %
1	20	0,53	5,4
2	20	2,79	6,42
3	20	7,23	5,54

### 9.4.2 Точність між аналізами

Зразок	n	Середнє нг/мл	КВ, %
1	12	0,53	7,21
2	12	2,95	6,17
3	12	7,8	6,87

## 9.5 Відтворюваність

Відтворюваність була вчислена шляхом додавання все більшого об'єму аналізу у три різні зразки виворотки пацієнта , котрі вміщують різні обсяги ендогенного аналізу. Кожний зразок був проаналізований і концентрації зразків були обчислені із стандартної кривої. Процентне відношення відтворення було вчислене при очікуваних і вимірних значеннях зразків.

Зразок	Ендог. 17- $\alpha$ -ОНП, нг/мл	Доданий 17- $\alpha$ -ОНП, нг/мл	Вимірний 17- $\alpha$ -ОНП, нг/мл	Очікуваний 17- $\alpha$ -ОНП, нг/мл	Відтворюваність, %
1	11,18	0,00	11,18	15,59	86,5
		10,00	13,48	9,34	105,3
		3,75	9,84	7,09	85,9
		1,50	6,09	6,34	85,0
2	1,43	0,00	1,43	10,71	902
		10,00	9,67	4,46	104,3
		3,75	4,66	2,21	111,9
		1,50	2,48	1,46	113,1
3	4,68	0,00	4,68	12,34	90,6
		10,00	11,18	6,09	99,1
		3,75	6,03	3,84	101,5
		1,50	3,90	3,09	112,8

## 9.6 Лінійність

Див. оригінал інструкції

## 10. ОБМЕЖЕННЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ

### 10.1 Взаємодіючі речовини

Будь-яке неправильне використання зразків чи зміна процедури тесту може дати неправильні результати. Гемоглобін (до 4 мг/мл), Білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 7,5 мг/мл) не впливають на результати тесту.

### 10.2 Взаємодія з ліками

НЕ має інформації щодо ліків, які можуть яким чином вплинути на визначення рівня Прогестерону 17 - $\alpha$ -ОН.

### 10.3 «Хук-ефект» високої дози

При проведенні тесту не спостерігалось «хук-ефекту».

## ЗАКОНОДАВЧІ АСПЕКТИ

Див. оригінал інструкції.

### Інформація для замовлення:

ПМП «ДІАМЕБ»  
Вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005  
Тел.: +38 (0342) 77 51 22  
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)



