

НАБІР РЕАГЕНТІВ ПРОГЕСТЕРОН ELISA

Progesterone ELISA

Каталог. №: **EIA-1561**

Дата випуску інструкції: **2020/02**
Версія **6.0**



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1. ВСТУП

1.1 Призначення

Даний набір – це імуноферментний аналіз для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання Прогестерону у сироватці або плазмі (ЕДТА, літій-гепаринаво або цитратна плазма).

1.2 Короткий опис

Прогестерон (прегн-4-ене-3, 20-діон) – це стероїдний гормон, який містить кето-групу (в С-3) і подвійний зв'язок між С- 4 та С-5 (1-4).

Цей стероїдний гормон жіночого роду, який у поєднанні з естрогенами, регулює допоміжні органи під час менструального циклу і особливо важливий у підготовці ендометрію для імплантації бластоцитів та підтримки вагітності. У невагітних жінок, Прогестерон в основному виділяється жовтим тілом, тоді як під час вагітності основним джерелом є плацента.

У невеликій кількості виробляється наднирковими залозами у обох статей та яєчками - у чоловіків.

Прогестерон циркулює у крові, в основному зв'язаний з Кортикостероїд-Зв'язуючим Глобуліном (CBG), Глобуліном, що зв'язує статеві гормони (SHBG) та Альбуміном.

Тільки 2-10% загальної концентрації циркулює як вільний гормон. Концентрації прогестерону у крові широко змінюються залежно від фази менструального циклу; вони нижчі, ніж 1 нг/мл (3,2 нмоль/л) під час фолікулярної фази і приблизно 10-20 нг/мл (32-64 нмоль/л) під час лютеїнової фази.

Максимальні рівні досягаються на 4-7 день після овуляції і залишаються підвищеними протягом 4-6 додаткових днів до початку передовуляційних рівнів за 24 години до початку менструації.

Оскільки, зростання та падіння прогестерону паралельно активності фолікулів яєчників та жовтого тіла, вимірювання прогестерону плазми клінічно використовуються для підтвердження овуляції та нормального функціонування жовтого тіла у невагітних жінок.

Якщо овуляція не відбувається, жовте тіло не формується і не спостерігається циклічного росту прогестерону у плазмі. Аномальна секреція прогестерону пов'язана з передменструальним напруженням, нерегулярним пролиттям ендометрію, дисменореєю та лютеїнової недостатності.

Концентрація прогестерону може змінюватися не тільки від суб'єкта до суб'єкта, але й у самій людині від дня до дня або навіть від години до години. Отже, при гінекологічних розладах або аномальних вагітностях рекомендується провидити серію вимірювань, замість одного, для відповідної інтерпретації результатів.

Під час вагітності, прогестерон широко виробляється плацентою, а рівні плазми постійно досягають значень до 200 нг/мл на термін.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір DRG Прогестерон ELISA – це твердофазний, ферментний, імуносорбентний аналіз (ELISA), який базується на **принципі конкурентного зв'язування**.

Мікротитрові лунки покриті поліклональним антитілом, спрямованим на антигенну ділянку на молекулі Прогестерону.

Під час першої інкубації, Прогестерон, який доданий до зразка пацієнта, конкурує з кон'югатом пероксидази тестостерону для зв'язування з покритим антитілом. Після етапу промивання, для видалення всіх незв'язаних речовин, тверда фаза інкубується з розчином субстрату. Колориметрична реакція раптово зупиняється після додавання стоп-розчину і вимірюється оптична щільність (ОЩ) отриманого продукту.

Інтенсивність утвореного кольору зворотно пропорційна концентрації аналіту у зразку. Стандартна крива будується шляхом позначення значень ОЩ до концентрацій стандартів, а концентрації невідомих зразків визначаються за допомогою цієї стандартної кривої.

3. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Цей набір тільки для діагностики *in vitro*.
2. Всі реагенти цього тестового набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані та визнані негативними на ВІЛ1/2, HBsAg та HCV, ІФА схваленими процедурами. Проте, всі реагенти слід вважати потенційно біологічно небезпечними при використанні та утилізації.
3. Перед використанням ретельно ознайомтеся з інструкцією. Використовуйте тільки дійсну версію інструкції, яка надається разом із набором. Переконайтеся, що все вам зрозуміло.
4. Мікропланшет містить відривні смужки. Невикористані лунки слід зберігати при температурі 2 – 8 °C у герметичній упаковці та використовувати разом з рамкою, яка постачається.
5. Піпетування зразків та реагентів повинне здійснюватися якомога швидше і з однаковими часовими інтервалами.
6. Використовуйте контейнери тільки для окремих реагентів. Це особливо стосується субстрату. Використовуючи контейнер для дозування розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може призвести до забруднення розчину.
7. Змішуйте вміст лунок ретельно, щоб забезпечити хороші результати випробувань. Не використовуйте повторно мікролунки.
8. Не дозволяйте лункам висохнути; додавайте реагенти негайно після завершення етапу промивання.
9. Дозволити реагентам нагрітися до кімнатної температури (20-26 °C) перед початком випробування. Температура буде впливати на читування оптичної щільності аналізу. Проте, значення для зразків пацієнтів не будуть порушені.
10. Ніколи не піпетувати ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкірою і слизовими оболонками.
11. Не палити, не їсти, не пити і не застосовувати косметику в тих місцях, де обробляються зразки або реагенти набору.
12. Одягати одноразові латексні рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробне забруднення реагентів чи зразків може давати помилкові результати.
13. Роботи зі зразками та реагентами повинні здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідними національними правилами біологічної безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
15. Всі зазначені обсяги повинні бути виконані відповідно до протоколу. Оптимальні результати випробувань будуть отримані тільки при використанні каліброваних піпеток і читувачів мікропланшетів.
16. Не слід змішувати або використовувати компоненти з наборів з різними номерами лотів. Рекомендується не змінювати місцями лунки різних пластин навіть одного і того ж лоту. Набори можуть транспортуватися або зберігатися в різних умовах і зв'язуючі характеристики планшетів можуть давати дещо інші результати.
17. Уникайте контакту зі Стоп-розчином, який містить 0,5 M H₂ SO₄. Це може викликати подразнення шкіри та опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND та/або MIT в якості консерванту. у випадку попадання в очі або на шкіру, негайно промити водою.
19. ТМБ субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизові. У випадку контакту, промийте очі великою кількістю води, шкіру водою з милом. Перед повторним використанням слід помити усі забруднені предмети. У випадку вдихання, виведіть потерпілого на свіже повітря.
20. Хімікати і приготувані або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи.
21. Для отримання інформації про небезпечні речовини, включені в набір, будь ласка, зверніться до Паспорта безпеки. Паспорти безпеки для даного продукту надаються за запитом безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які надаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 стрипів, 96 лунок, покритих поліклональним анти-прогестерон антитілом.
2. **Стандарт (стандарт 0-6)**, 7 фл., по 1 мл кожен, готові до використання;
Концентрації: 0-0,3-1,25-2,5-5-15-40 нг/мл
Конверсія: 1 нг/мл=3,18 нмоль/л
3. **Ферментний кон'югат**, 1 фл., 25 мл, готовий до використання;
Прогестерон, кон'югований з пероксидазою хрому;
не містить ртутний консервант.
4. **Розчин субстрату**, 1 фл., 25 мл, готовий до використання;
Тетраметилбензидин (ТМБ).
5. **Стоп-розчин**, 1 фл., 14 мл, готовий до використання;
Містить 0,5 M H₂SO₄. Уникайте контакту зі стоп-розчином. Він може спричинити подразнення або опіки.

- 6. Розчин для промивання**, 1 фл. 30 мл (40х концентрований);
Див. «Приготування реагентів»

Примітка: Додатковий 0 стандарт для розведення зразка доступний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, які не постачаються

1. Мікропланшетний рідер, (450 нм, з референтною довжиною від 620 нм до 630 нм) (напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
2. Калібровані мікропіпетки зі змінною точністю
3. Абсорбуючий папір
4. Дистильована вода
5. Таймер
6. Графічний папір або програмне забезпечення для скорочення даних

4.3 Умови зберігання

За умови зберігання при 2-8°C невідкриті реагенти будуть зберігати свою реактивність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Всі відкриті реагенти слід зберігати при температурі 2-8°C. Мікротитрові лунки слід зберігати при температурі 2-8°C. Після відкриття реагенти слід знову герметично закрити. Відкриті набори зберігають активність протягом 8 тижнів за умови зберігання як описано вище.

4.4 Приготування реагентів

Перед використанням доведіть усі реагенти та необхідну кількість стріпів до кімнатної температури (20°C - 26 °C).

Промивний розчин

Додайте дистильовану воду до 40X концентрованому Промивного розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного розчину з 1170 мл дистильованої води, щоб отримати кінцевий об'єм 1200 мл.

Промивний розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору слід здійснювати відповідно до державних вимог. Спеціальна інформація для цього продукту вказана у Паспорті безпеки, розділ 13.

4.6 Пошкодження набору

У випадку сильного пошкодження набору або його компонентів, слід повідомити про це виробника у письмовій формі протягом 1 тижня після отримання набору. Сильно пошкоджені компоненти не можна використовувати для проведення аналізу. Їх слід зберігати до отримання кінцевого рішення. Після цього, їх слід утилізувати згідно офіційних вимог.

5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Для аналізу слід використовувати сироватку або плазму (EDTA, літій-гепарин або цитратну плазму).

Примітка: Зразки, які містять азид натрію не можна використовувати для аналізу.

Загалом, слід уникати використання гемолітичних, іктеричних або ліпемічних зразків. За додатковою інформацією дивитися розділ «Інтерферуючі речовини».

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Зробіть забір крові шляхом венепункції (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дайте можливість згорнутися та відокремте сироватку шляхом центрифугування при кімнатній температурі. Не центрифугуйте, якщо не відбулося повне згортання. Для крові пацієнтів, які проходять лікування антикоагулянтами потрібно більше часу для згортання.

Плазма:

Забір цільної крові слід робити у центрифужні пробірки, які містять антикоагулянт, (напр. Sarstedt Monovette – з відповідно приготовленою плазмою) та центрифугувати негайно після забору.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закритими та зберігатися до 7 днів при температурі 2-8°C перед тестуванням.

Для тривалого зберігання (до 12 місяців) зразки слід заморозити тільки один раз при -20°C до проведення аналізу. Розморожені зразки слід кілька разів інвертувати перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо на початку аналізу виявилось, що зразок містить більше ніж найвищий стандарт, то зразки необхідно розвести *0 стандартом* та повторно проаналізувати.

Для обчислення концентрацій цей фактор розведення слід врахувати.

Наприклад:

- Розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл 0 стандарту (ретельно перемішати);
- Розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл 0 стандарту (ретельно перемішати)

6. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

6.1 Загальні зауваження

- Перед використанням усі реагенти слід довести до кімнатної температури. Усі реагенти слід перемішати без утворення піни.
- Після початку тестування усі етапи слід виконувати без перерви.
- Кожного разу використовуйте нові наконечники для дозаторів для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Оптична щільність – це функція часу та температури інкубації. Перед початком проведення тесту, рекомендується, щоб усі реагенти були готові, кришечки зняті, усі необхідні лунки закріплені на тримачі, та ін. Це забезпечить однаковий інтервал часу для етапу піпетування без перерви.
- Як правило, ферментна реакція – лінійно пропорційна часу та температурі.

6.2 Процедура тестування

Кожен аналіз повинен включати стандартну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок на тримачі.
2. Внесіть **25 мкл** кожного **Стандарту, Контролю** і **зразка**, використовуючи нові одноразові наконечники, у відповідні лунки.
3. Інкубуйте протягом **5 хвилин** при кімнатній температурі.
4. Додайте **200 мкл Ферментного кон'югату** у кожен лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На даному етапі дуже важливо повністю перемішати.
5. Інкубуйте протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
6. Промийте лунки **3 рази** із 400 мкл розведеного Промивного розчину на лунку, якщо використовуєте вошер для пластин – або-

Різно витрусіть вміст із лунок.

Промийте лунки 3 рази з 300 мкл розведеного Промивного розчину на лунку для ручного миття. Різно витрусіть лунки на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки води.

Важливо: чутливість та точність даного аналізу залежить від правильно проведеної процедури миття!

7. Додайте **200 мкл Розчину субстрату** у кожен лунку.
8. Інкубуйте протягом **15 хвилин при кімнатній температурі**.
9. Додайте **100 мкл Стоп- розчину** у кожен лунку, щоб зупинити ферментну реакцію.
10. Виміряйте оптичну щільність (ОЩ) розчину у кожній лунці при **450 нм (зчитування) та від 620 нм до 630 нм (рекомендується, віднімання фону)** за допомогою мікротитрового зчитувача пластин.

6.3 Обчислення результатів

1. Обчисліть середнє значення оптичної щільності (ОЩ) для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнтів.
2. За допомогою графічного паперу, побудуйте стандартну криву позначаючи середню ОЩ, отриману із кожного стандарту проти його концентрації зі значенням ОЩ на вертикальній осі Y та концентрації на горизонтальній осі X.
3. Використовуючи середнє значення ОЩ для кожного зразка визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичний метод: результати в інструкції з використання були обчислені автоматично за допомогою 4- Параметрової кривої. (4 Parametr Rodbard or 4 Parametr Marquardt є кращими методами). Інші функції зменшення даних можуть давати дещо інші результати.
5. Концентрацію зразків можна зчитати прямо зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вищою ніж концентрація найвищого стандарту слід розвести або вказати як > 40 нг/мл. Під час обчислення концентрацій цей фактор розведення слід врахувати.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої:

Наступні дані наведені тільки для демонстрації і не можуть використовуватися замість даних отриманих під час аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1.52
Стандарт 1 (0,3 нг/мл)	1.17
Стандарт 2 (1,25 нг/мл)	0.88
Стандарт 3 (2,5 нг/мл)	0.69
Стандарт 4 (5,0 нг/мл)	0.55
Стандарт 5 (15 нг/мл)	0.35
Стандарт 6 (40 нг/мл)	0.13

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свої власні значення норми і патології.

У дослідженні, яке проводили на здорових дорослих людях, з використанням набору Прогестерон ІФА від DRG, отримали наступні дані:

Населення	К-сть	Середнє (нг/мл)	Медіан (нг/мл)	2,5 ^й -97,5 ^й процентиль (нг/мл)	Діапазон (мін. – макс.) (нг/мл)
Чоловіки	49	0.36	0.34	0.05 – 0.92	0.05 – 0.94
Жінки					
Фолікулярна фаза	35	0.79	0.76	0.21 – 1.72	0.21 – 1.80
Лютеїнова фаза	45	12.89	13.00	3.78 – 24.60	2.90-27.10
Постменопауза	28	0.53	0.59	0.18 – 0.83	0.15-0.84

Самі лише результати не можуть бути єдиною причиною для терапевтичних заходів. Результати слід співставляти з іншими клінічними дослідженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Згідно лабораторної практики, контролю необхідно запускати разом з калібрувальною кривою. Статистично, слід проаналізувати значну кількість контролів, щоб встановити середні значення та прийнятні діапазони для забезпечення належної роботи.

Рекомендується використовувати контролі відповідно до державних і місцевих правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі як нормального рівня так і патологічного.

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

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

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу значень контролю та тенденцій. Якщо результати аналізу не попадають у встановлені межі матеріалів контролю, результати є 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 або безпосередньо до компанії DRG.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон налізу знаходиться між 0.140 нг/мл – 40.0 нг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність в аналізі:

Стероїд	Перехресна реакція (%)
Прогестерон	100.00
17α ОН Прогестерон	0.30
Естріол	< 0.10
Естрадіол 17β	< 0.10
Тестостерон	< 0.10
11-Дезоксикортикостерон	1.10
DHEA-S	< 0.02
Кортизол	< 0.02
Кортикостерон	0.20
Прегненолон	0.35
Кортизон	< 0.10
11-Дезоксикортизол	0.10

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість була обчислена шляхом віднімання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повторних аналізів 0 стандарту і дорівнювала 0.045 нг/мл.

Межа Бланку (LoB) становить 0.120 нг/мл.

Межа виявлення (LoD) становить 0.140 нг/мл.

Межа кількісної оцінки (LoQ) становить 0.144 нг/мл.

9.4 Точність

9.4.1 Всередині аналізу

Змінюваність в аналізі показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	20	0.6	5.4
2	20	4.7	7.0
3	20	10.8	6.9

9.4.2 Між аналізами

Змінюваність між аналізами показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	12	0.6	10.0
2	12	4.6	4.3
3	12	10.7	5.6

9.4.3 Між лотами

Змінюваність між аналізами (між лотами) визначали шляхом повторних вимірювань зразків з наборів з різними лотами.

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	18	1.2	7.2
2	18	38.7	3.1

9.5 Відновлення

Зразки збагатили шляхом додавання розчинів прогестерону при відомих концентраціях.

% відновлення обчислили шляхом множення коефіцієнту вимірювання на очікуваних значень на 100.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (нг/мл)	1.6	4.2	11.0
Середнє відновлення (%)	101.9	104.1	97.0
Діапазон відновлення (%)	від 97.8 до 112.0	96.3 до 109.0	90.9 до 105.6

9.6 Лінійність

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (нг/мл)	1.6	4.2	11.0
Середнє відновлення (%)	102.5	99.1	106.5
Діапазон відновлення (%)	від 92.0 до 111.9	87.8 до 110.3	104.7 до 108.6

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкції і з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 1.8 мг/мл).

10.2 Побічний ефект

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарств), що впливають на вимірювання Прогестерону в зразку.

10.3 Висока доза хук-ефекту

У цьому тесті відсутній хук-ефект.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Тест необхідно проводити згідно інструкцій виробника. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (Good Laboratory Practice) або інших використовуваних національних стандартів та/або законів. Це особливо стосується використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в тестовій процедурі достатню кількість контролів для перевірки точності та достовірності тесту.

Результати випробувань є дійсними лише тоді, коли всі контролі знаходяться в межах вказаних діапазонів і якщо всі інші параметри

випробувань також входять до заданих специфікацій аналізу. У разі виникнення будь-яких сумнівів або занепокоєння звертайтеся до DRG.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного тесту, а повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки, якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта. Тільки один результат не може бути детермінантом для встановлення терапевтичних заключень.

11.3 Надійність

Будь-яка зміна набору і / або заміна компонентів різних партій з одного набору або з іншого може негативно вплинути на результати і весь тест в цілому. Така заміна не може бути підставою для претензії або запиту на заміну комплекту.

Претензії у випадках неправильного використання лабораторії, що містяться в пункті 11.2, також можуть бути недейсними. Якщо ми цього не побачимо, в разі будь-яких претензій виробник зобов'язаний не збільшувати вартість набору. Виробник не несе відповідальності за пошкодження комплекту в результаті неправильного транспортування.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

