

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА

2077Z, Progesterone

Каталог. № : 2077Z
Производитель: DAI (США)

Методика от 03-26-2012



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала инструкции и перевода должны совпадать.

Анализ	Progesterone ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-50 нг/мл
Образец	25 мкл сыворотки / плазмы
Специфичность	100 %
Чувствительность	0, 3 нг/мл
Общее время	~ 110 мин.
Срок годности	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации прогестерона в сыворотке или плазме человека.

ВВЕДЕНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Прогестерон ИФА основывается на принципе конкурентоспособного связывания между прогестероном в анализируемом образце и прогестерон-HRP конъюгатом, в стабильном количестве анти-прогестерона кролика. В процессе инкубации лунки, покрытые козлиным анти-кроличьим IgG инкубируются при комнатной температуре (18-25°C) в течение 90 минут с 25 мкл стандартов прогестерона, контролями, образцами пациентов, 100 мкл реагента прогестерон-HRP конъюгата 50 мкл реагента анти-прогестерона кролика. В течение инкубации, закрепленное количество HRP-меченого прогестерона конкурирует с эндогенным прогестероном в стандарте, образце, или сыворотке контроля качества на определенных местах связывания специфичного антитела прогестерона. Таким образом, количество конъюгата пероксидазы прогестерона, иммунологически связанного с лункой, интенсивно уменьшается, так как концентрация прогестерона в образце увеличивается.

Затем несвязанный конъюгат пероксидазы прогестерона удаляется и лунки промываются. Затем, добавляется раствор ТМБ реагента и инкубируется при комнатной температуре в течении 20 минут, приводя к образованию синего цвета. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, и абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна количеству присутствующего фермента и противоположна количеству непомяченного прогестерона в образце. Калибровочная кривая получается путем составления графика концентрации стандарта против меры поглощения света. Концентрация прогестерона в образцах и контролях, анализируемая одновременно со стандартами может быть рассчитана от калибровочной кривой.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые в наборе материалы:

- Козлиные анти-кроличьи покрытые IgG микротитровальные лунки, 96 лунок.
- Референтные стандарты прогестерона: 0, 0,5, 3,0, 10, 25 и 50 нг/мл. Жидкие, по 0,5 мл каждый, готовые к использованию.
- Реагент кроличьих антител к прогестерону (розового цвета), 7 мл.
- Концентрат конъюгата прогестерон-HRP (11x), 1,3 мл.
- Разбавитель конъюгата прогестерон-HRP, 13 мл.
- Прогестерона контроль 1, жидкий, 0,5 мл, готовый к использованию.
- Прогестерона контроль 2, жидкий, 0,5 мл, готовый к использованию.

- ТМБ-реагент (одноэтапный), 11 мл.
- Стоп-раствор (1 N HCl), 11 мл.

Требуемые, но не поставляемые материалы:

- Точные пипетки: 25, 50, 100, 200 мкл и 1,0 мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Вихревой смеситель или его аналог.
- Абсорбирующая бумага или бумажное полотенце.
- Миллиметровая бумага.
- Микротитровальный планшетный считыватель.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Не существует методик, дающих полную гарантию отсутствия вируса гепатита В, ВИЧ/ЛАВ, или других инфекционных агентов в реагентах набора. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы пациентов, должны рассматриваться как потенциально инфекционными.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться только сыворотка человека. Образцы не нуждаются в специальной предварительной обработке. Образцы сыворотки могут храниться до 24 часов при 2-8°C и должны замораживаться при -10°C или ниже при более длительном хранении. Не используйте высоко гемолизированные или липемические образцы.

Примечание: не должны использоваться образцы, содержащие азид натрия.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Невыскранные наборы должны храниться после извлечения при 2-8°C и микротитровальный планшет должны содержаться в герметичном пакете с осушителями, чтобы минимизировать влияние влажного воздуха. Открытые наборы будут сохранять свою активность до окончания срока годности при соблюдении вышеуказанных условий хранения. Микротитровальный планшетный считыватель с шириной световой дорожки 10 мм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-3 ОП при длине волны 450 нм подходит для использования измерения абсорбции.

ПРЕПАРИРОВАНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Приведите все реагенты, что будут использоваться к комнатной температуре (18-25°C).
2. **Чтобы приготовить Рабочий реагент конъюгата прогестерон-HRP, добавьте 0,1 мл Концентрата конъюгата прогестерон-HRP (11x) к 1,0 мл разбавителя конъюгата прогестерон-HRP (1:10 разбавление) и хорошо перемешайте. Количество разбавляемого конъюгата зависит от объема анализа. Удалите излишек после использования.**
3. Образцы с ожидаемыми концентрациями прогестерона более чем 50 нг/мл могут быть проанализированы количественно путем разбавления разбавителем, располагаемым продавцом.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите в держателе желаемое количество покрытых лунок, которые будут использоваться.
2. Пипеткой внесите 25 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл **рабочего реагента конъюгата прогестерон-HRP** в каждую лунку.
4. Распределите 50 мкл реагента кроличьих антител к прогестерону в каждую лунку.
5. **Тщательно перемешивайте в течении 30 сек. Очень важно полностью перемешать.**
6. Инкубируйте 90 минут при комнатной температуре (18-25°C).
7. Промойте лунки дистиллированной или деионизированной водой 5 раз и встряхните их содержимое. (Не использовать проточную воду).
8. Внесите 100 мкл ТМБ реагента в каждую лунку. Осторожно перемешайте в течении 10 сек.
9. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре (18-25°C).
10. Остановите реакцию путем добавления 100 мкл стоп раствора в каждую лунку.
11. Измерьте абсорбцию при 450 нм с помощью микротитровального планшетного считывателя в течении **15 минут.**

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите значение средней абсорбции (A_{450}) для каждого набора референтных стандартов, контролей и образцов.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его

концентрации в нг/мл на **миллиметровой бумаге** при значениях абсорбции на оси У и концентрациях на оси Х.

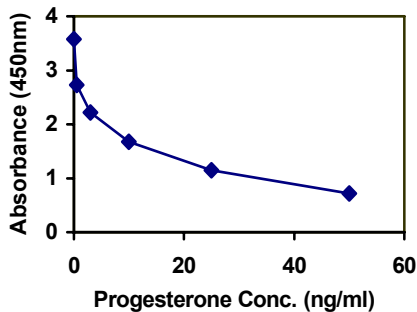
- Используя значения средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию прогестерона в нг/мл на калибровочной кривой.
- Образцы с ожидаемыми концентрациями прогестерона более 50 нг/мл могут анализироваться количественно путем разбавления разбавителем, располагаемым продавцом.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной процедуры анализа стандарта, выполненного с чтениями оптической плотности при 450 нм показанный на У оси против концентраций прогестерона, показанных на оси Х.

Примечание: Эта калибровочная кривая предназначена только для иллюстрации, и не должна использоваться для вычисления неизвестных величин. Каждая лаборатория в каждом эксперименте должна разработать свои собственные данные и калибровочную кривую.

Прогестерон (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	2,719
0,5	1,937
3	1,391
10	0,828
25	0,528
50	0,291



ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные значения нормы. Прогестерон ИФА исследовался на клинических лабораторных образцах выборочных пациентов.

Мужчины: взрослые	0,13 – 0,97 нг/мл
Дети (препубертатный) период	0,70 – 0,52 нг/мл
Женщины: фолликулярная фаза	0,15 – 0,70 нг/мл
Лютеальная фаза	2,00 – 25,0 нг/мл
Пост-менопауза	0,06 – 1,60 нг/мл

Беременность:

1 ^я ТРИМЕСТР	10,3 – 44,0 нг/мл
2 ^я ТРИМЕСТР	19,5 – 82,5 нг/мл
3 ^я ТРИМЕСТР	65,0 – 229 нг/мл

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация прогестерона ИФА при измеренном из среднего значения нулевого стандарта 2 СО составила 0,3 нг/мл.

2. Точность

а. Точность в анализе

Точность в анализе была определена путем анализа репликатов 4 разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариативность в анализе указана ниже:

Образцы	1	2	3	4
К-во репликатов	24	24	24	24
Средн. прогестерона (нг/мл)	1,8	8,0	21,7	44,8
СО	0,1	0,2	0,7	1,1
КВ (%)	7,1	2,6	3,3	2,4

б. Точность между анализами

Точность между анализами была определена путем анализа репликатов 6 разных образцов сыворотки в ряде отдельно откалиброванных анализов. Вариативность между анализами указана ниже:

Образцы	1	2	3	4
К-во репликатов	20	20	20	20
Средн. прогестерона (нг/мл)	1,7	7,9	21,0	44,6
СО	0,2	0,4	1,2	1,1
КВ (%)	12,6	4,5	5,9	2,6

3. Линейное исследование

Для определения линейности 4 образца пациентов были последовательно разбавлены. Средняя линейность составила 105,9%.

(См. Таблицу в оригинале инструкции)

4. Исследование восстановления

Различные образцы сыворотки пациентов известных уровней прогестерона были объединены или проанализированы в дубликаты. Среднее восстановление составило 111,3%.

№ пары	Ожидаемое (нг/мл)	Полученное (нг/мл)	% восстановления
1	41,5	43,1	103,9
2	43,1	45,7	106,1
3	19,9	19,8	99,1
4	18,0	19,2	106,4
5	3,8	4,3	115,4
6	7,3	8,7	118,6
7	0,8	0,7	80,4

5. Специфичность

Следующие вещества были проверены на перекрестную реактивность. Процент указывает на перекрестную реактивность при смещении 50 % по сравнению с прогестероном.

Данные относительно перекрестной реактивности для нескольких эндогенных и фармацевтических стероидов обобщены в следующей таблице:

Перекрестная реактивность (%) = $\frac{\text{Полученная концентрация прогестерона}}{\text{Концентрация стероида}} \times 100$

Стероид

Прогестерон	100%
Андростерон	0,086%
Кортикостерон	0,74%
Кортизон	0,11%
Холестерол	<0,08%
Эстрадиол	<0,01%
Эстрон	0,08%
Эстриол	<0,024%
Преднизолон	0,075%
Тестостерон	0,1%

Перекрестная реактивность

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1. Документальное фиксирование овуляции

Наблюдение за концентрацией прогестерона во время менструального цикла является полезным в фиксировании овуляции. Концентрация прогестерона > 3,0 нг/мл будет весомым указателем овуляции.

2. Уровни прогестерона в норме против аномальных

Большие за норму уровни могут указывать на беременность. Высокий уровень также может указывать на рак надпочечников или яичников, молярную беременность, или чрезмерное вырабатывание гормонов надпочечниками. Однако, уровни прогестерона повышенные во время не однократной беременности, чем во время одной беременности.

Уровни ниже за норму могут указывать на аменорею. Аномально низкие уровни прогестерона могут также указывать на проблемы с овуляцией. В беременной женщины уровни прогестерона упавшие до < 5 нг/мл могут указывать на угрозу выкидыша.

3. Эктопическая беременность

Прогестерон может быть также полезен в диагностике эктопической болезни. Для значений < 25 нг/мл во время беременности жизнеспособность плода необходимо проверить ультразвуком. Однако, прогестерон < 5 нг/мл в первом триместре указывает на отсутствие жизнеспособности процесса беременности не зависимо от расположения плода.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Достоверные и воспроизводимые результаты будут получены, когда процедура анализа выполнена с полным пониманием

- указаний вкладыша набора и при соблюдении квалифицированной лабораторной практики.
2. Процедура промывки крайне важна. Недостаточная промывка приведет к неполной точности и ошибочно повышенным считываниям абсорбции.
 3. Не используйте в анализе сильно гемолизированные, липемические или мутные образцы.
 4. Результаты, полученные от использования этого набора должны использоваться только как дополнение к другим диагностическим процедурам и информации, располагаемой врачом.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Квалифицированная лабораторная практика требует, чтобы контроли использовались в каждой калибровочной кривой. Статистически важное количество контролей должно анализироваться, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, чтобы обеспечить соответствующую эффективность набора.

В качестве контроля рекомендуется использовать **BIO-RAD LYRHOСHEK IMMUNOASSAY CONTROL SERA**. Данный набор также поставляется с внутренними контролями, Уровень 1 и 2.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com