

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА В МОЛОКЕ КОРОВ
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
«ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М»

Утверждена Главным управлением ветеринарии

Минсельхозпрода Республики Беларусь

« 22 » августа 2005 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реактивов «ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М» предназначен для количественного определения прогестерона в молоке коров методом иммуноферментного анализа.

1.2 Прогестерон – стероидный гормон с молекулярным весом 314. Количественное определение уровня прогестерона в молоке имеет диагностическое значение при оценке состояния фетоплацентарной системы и может быть использовано для определения стельности коров.

1.3 Пробы для анализа следует брать на **20-25-й день после осеменения** вручную из каждой четверти вымени сразу после дойки (но не позднее, чем через 1,5 часа). В пробирки, поставляемые в наборе, собрать по 1,5-2 мл молока (не более 1/2 объема пробирок). Молоко может храниться до 48 часов при 2-8 °С. Для более длительного хранения можно заморозить пробы при – 20 °С.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

-планшет, разборный 96-луночный, состоящий из укрепленных на рамке 12-ти восьмилуночных стрипов с иммобилизованными антителами к прогестерону;

-калибровочные пробы, содержащие известные количества прогестерона в диапазоне концентраций (0 – 100) нг/мл (точные концентрации гормона указаны на этикетках), жидкие препараты, 6 флаконов, по 0,5 мл;

-контрольная проба, жидкий препарат, 1 флакон, 0,5 мл;

-конъюгат прогестерон-пероксидаза, жидкий препарат, 1 флакон, 21 мл;

- субстратный раствор, 1 флакон, 10 мл;

-хромоген, жидкий препарат, 1 флакон, 1,0 мл;

-стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, 6 мл;

2.2 Набор «ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, 1 контрольной и 6 калибровочных проб (всего 96 определений) при использовании всех стрипов одновременно.

2.3 Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата прогестерон-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным прогестероном пробы молока с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами прогестерона и конъюгата прогестерон-пероксидаза. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству прогестерона в образце пробы молока. Во время инкубации с хромоген-субстратом происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата прогестерон-пероксидаза. После измерения оптической плотности растворов в лунках по калибровочной кривой рассчитывается концентрация прогестерона в определяемых образцах.

3 ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ ПО ХРАНЕНИЮ РЕАГЕНТОВ И ВЫПОЛНЕНИЮ ТЕСТА

3.1 Не смешивайте и не используйте в одном эксперименте реагенты разных серий.

3.2 После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона или пробирки. **Внимание:** закрывайте каждый флакон **своей** крышкой.

3.3 Все компоненты набора должны храниться в холодильнике при (2-8) °С. **Не замораживайте набор.**

3.4 После вскрытия планшета оставшиеся неиспользованные стрипы хранить в **закрытом** полиэтиленовом пакете, чтобы предотвратить воздействие на них влаги.

3.5 Не используйте для отмывки лунок растворы из других наборов, так как они могут содержать азид натрия. Азид натрия даже в следовых количествах ингибирует маркерный фермент – пероксидазу, что может привести к снижению сигнала.

3.6 Все пробы желательно ставить **в двух параллелях**.

3.7 При добавлении проб необходимо использовать **одноразовые наконечники**.

3.8 Исследуемые пробы молока должны быть **чистыми** (без примесей) **и однородными**.

3.9 Молоко можно хранить при (2-8) °С в течение 48 ч. Для более длительного хранения допускается **однократное** замораживание до температуры не менее минус 20 °С. Повторное замораживание-оттаивание не допускается.

3.10 Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

-Одноканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объем жидкости 0,02 мл;

-вариабельная полуавтоматическая восьмиканальная пипетка, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 0,05 до 0,25 мл;

-кювета для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки;

-пробирки вместимостью (3-5) мл;

-вихревой смеситель типа «Vortex» (приспособление для встряхивания);

-спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм;

-мерный цилиндр, позволяющий отмерять 15 мл;

-стеклянный стакан вместимостью 50 мл;

-дистиллированная вода.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1 Планшет. Вскрыть упаковку и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить при (2-8) °С в закрытом полиэтиленовом пакете.

5.2 Калибровочные и контрольная пробы готовы к использованию. Перед внесением в лунки калибровочные пробы и контрольную пробу необходимо тщательно перемешать, используя вихревой смеситель. При перемешивании пипеткой на каждую калибровочную пробу и контрольную пробу необходимо использовать отдельный наконечник.

5.3 Приготовление раствора проявителя. При подготовке раствора проявителя на 96 лунок планшета во флакон субстратным раствором добавить 0,5 мл раствора хромогена, тщательно перемешать. При дробном использовании планшета необходимо смешивать хромоген и субстратный раствор в соотношении 1:20. Например, при использовании 32 лунок в чистый флакон отобрать 3,5 мл субстратного буферного раствора и добавить 0,175 мл раствора хромогена, тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! *Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.*

5.4 Стоп-реагент готов к использованию.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 В зависимости от количества определяемых образцов подготовить необходимое количество реагентов, которые перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной (20-25) °С температуры.

6.2 Внести в соответствующие лунки по 0,02 мл калибровочных проб и анализируемых образцов (**тщательно перемешанных !!!**) в дубликатах.

6.3 Внести во все лунки по 0,2 мл раствора конъюгата прогестерон-пероксидаза.

6.4 Инкубировать планшет при комнатной температуре (20-25) °С в течение 2 ч либо в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч.

6.5 По окончании инкубации перевернуть планшет вверх дном и стряхнуть над раковиной для удаления содержимого лунок. Промыть лунки 3 раза дистиллированной водой. При каждой промывке во все лунки внести по 0,25 мл дистиллированной воды с последующим ее удалением. При декантировании (можно использовать вакуумный отсос) тщательно удалять остатки воды из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Также возможно использование автоматического промывателя планшетов.

6.6 Во все промытые лунки **немедленно** внести по 0,1 мл проявителя, приг. по п. 5.3 и инкубировать при комнатной температуре (20-25) °С в темном месте в течение 15 мин.

6.7 Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,05 мл раствора стоп-реагента.

6.8 Измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора во всех лунках при длине волны 450 нм сразу, но не позднее, чем через 15 минут после остановки реакции.

6.9 В полулогарифмических координатах построить для калибровочных проб график зависимости (см. Рис.1) оптической плотности от концентрации прогестерона в калибровочных пробах (нг/мл). По калибровочному графику определить содержание прогестерона в исследуемых образцах. Используя таблицу 2, определить физиологическое состояние испытуемого животного.

При наличии программируемого ридера возможен автоматический расчет результатов анализа. При автоматическом расчете используйте кусочно-линейный метод для обсчета значений.

7 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

7.1 Специфичность. Перекрестная реакция антител к прогестерону с другими стероидами приведена в таблице 1.

Таблица 1

Стероид	Перекрестная реакция, %
Прогестерон	100
Эстриол	0,2
Преднизолон	0,6
11-Дезоксикортизол	0,09
Кортикостерон	0,06
Дезоксикортикостерон	<0,1
Прегненолон	<0,1
Тестостерон	<0,1

7.2 Коэффициент вариации результатов 10 определений прогестерона в одном и том же образце с использованием набора не превышает 10%.

7.3 Тест на «открытие». При постановке теста на «открытие» смешивают равные объемы контрольной и калибровочной проб. Процент открытия составил (85-115)%.

7.4 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора «ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М» провести наработку собственных лабораторных данных, отражающих уровень прогестерона в молоке коров, соответствующий данному физиологическому состоянию животного.

В таблице 2 приведены ориентировочные данные, полученные при измерении концентрации прогестерона в молоке коров.

Таблица 2

Состояние животного	Концентрация прогестерона, нг/мл
Стельные	более 7
Сомнительные	4 – 7
Нестельные	менее 4

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1 Набор «ИФА-ПРОГЕСТЕРОН-М» должен храниться при температуре (2-8) °С.

8.2 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой;

для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции и квалифицированное проведение анализа.