

Помимо действия на репродуктивную систему, пролактин играет роль в поддержании постоянства внутренней среды, регулируя иммунную систему, водно-солевой баланс, ангиогенез. Этот гормон является общим медиатором иммуно-нейро-эндокринной системы.

1.3. Количественное определение содержания пролактина в сыворотке крови может быть использовано для оценки гормонального статуса, диагностики и контроля эффективности терапии нарушений репродуктивной функции, бесплодия, диагностики гиперплазий и аденом гипофиза, оценки эффективности лечения опухолей гипофиза.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к пролактину. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит связывание пролактина с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина плюс происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации пролактина в анализируемых пробах.

Концентрацию пролактина в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания пролактина в калибровочных пробах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к пролактину, готовый для использования – 1 шт.;

- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по третьему Международному стандарту NIBSC 84/500, содержащие известные количества пролактина – 0; 150; 300; 750; 1500; 3000 мМЕ/л; концентрации пролактина в калибровочных

пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,5 мл);

- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием пролактина, готовая для использования – 1 флакон (0,5 мл);

- конъюгат моноклональных антител к пролактину с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (25 мл);

- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12 мл);

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);

- раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);

- плёнка для заклеивания планшета – 1 шт.;

- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;

- ванночка для реагента – 2 шт.;

- наконечники для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции моноклональных антител к пролактину с соматотропным, тиреотропным, лютеинизирующим и фолликулостимулирующим гормонами человека.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения пролактина в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ПРОЛАКТИН-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации пролактина в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей пролактин, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 150-3000 мМЕ/л и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации пролактина предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 300 мМЕ/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация пролактина не превышает 15 мМЕ/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация пролактина у 120 здоровых доноров юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет находилась в интервале: для мужчин 57–600 мМЕ/л, для женщин 69–750 мМЕ/л.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации пролактина, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм

и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $+37 \pm 1$ °С и 400-800 об/мин;

- промывочное устройство для планшетов;

- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;

- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, с изменяемым объемом отбора жидкостей на: 5 – 50 мкл, 50 – 350 мкл;

- флаконы стеклянные вместимостью 30 мл;

- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

- колба вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые или пластиковые;

- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре $+18-25^{\circ}\text{C}$ в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся

УТВЕРЖДЕНА

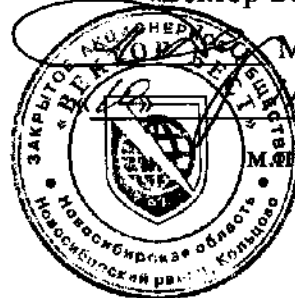
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусайнов

2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения

концентрации пролактина

в сыворотке крови

(ПРОЛАКТИН-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ПРОЛАКТИН-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации пролактина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пролактин (лактогенный гормон) представляет собой полипептид с молекулярной массой около 23 кДа, секретирующийся лактотрофными клетками передней доли гипофиза. Он имеет структурное сходство с соматотропным гормоном и плацентарным лактогеном. Выделяют 4 изоформы пролактина с различной молекулярной массой и биологической активностью.

Пролактин является важным полифункциональным гормоном, большинство биологических эффектов которого связано с репродуктивной функцией. Гиперпролактинемия, возникающая в результате различных нарушений в гипоталамо-гипофизарной системе, приводит к нарушениям менструального цикла, бесплодию, галакторее у женщин и снижению потенции, тестикулярной недостаточности у мужчин. Одной из наиболее частых причин развития этого синдрома являются доброкачественные опухоли гипофиза (аденомы).

Инструкция составлена: сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной.

неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Подготовка калибровочных проб и контрольной сыворотки.

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть. После вскрытия флаконов хранить при температуре 2-8 °С не более 1 мес.

7.4. Приготовление промывочного раствора.

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30-40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре +2-8 °С не более 5 сут.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в ванночку для реагента за 5-10 мин до начала постановки анализа.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора тетраметилбензидина плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента за 5-10 мин до окончания инкубации и поместить в защищенное от света место.

Раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор тетраметилбен-зидина плюс, мл
	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	96	4,0	2,0
3	6,0	144	6,0	3,0
4	8,0	192	8,0	4,0
5	10	240	10	5,0
6	12	288	12	6,0
7	14	336	14	7,0
8	16	384	16	8,0
9	18	432	18	9,0
10	20	480	20	10
11	22	528	22	11
12	24	576	24	12

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл каждой калибровочной пробы и по 20 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

7.8. Во все лунки внести по 200 мкл конъюгата (см п. 7.5). Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре $+37 \pm 1$ °C и 650 об/мин.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.4), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После каждой промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.6).

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Остатки раствора тетраметилбензидина плюс из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором тетраметилбензидина плюс).

7.12. Планшет инкубировать в темноте в течение 15 мин при комнатной температуре (+18-25 °С).

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации пролактина в калибровочных пробах (мМЕ/л).

9.2. Определить содержание пролактина в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов ПРОЛАКТИН-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре +2–8 °C в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °C в течение всего срока годности;

- раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °C не более 1 мес;

- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, раствор для разведения сывороток и конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °C не более 1 мес;

- промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °C не более 5 сут;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации пролактина в контрольной сыворотке.

10.3. Для представления результатов измерений концентрации пролактина в нг/мл применять коэффициент пересчета 0,033 (1 мМЕ/л пролактина = 0,033 нг/мл пролактина).

10.4. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2–8 °C не более 24 ч или при температуре минус 20 °C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

10.5. Если концентрация пролактина в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 3000 мМЕ/л, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10.6. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.7. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора ПРОЛАКТИН-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-Бест», тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383) 336-60-30, 332-67-52,

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Ю. Рукавишников

Зав. лабораторией НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 Н.Н. Сорокина

Ректор СГМУ им. В.И. Разумовского
Росздрава



В.М. Попков





расшнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 листов

[Handwritten signature]