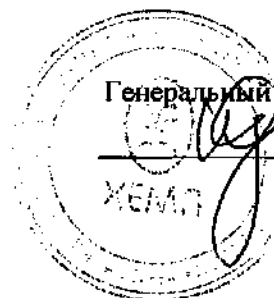


УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2010 г.

№ _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

11 января 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения
пролактина в сыворотке (плазме) крови

«ПРОЛАКТИН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации пролактина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пролактин представляет собой полипептид из 198 аминокислот с молекулярной массой около 22500 Да, секретируемый эозинофилами передней доли гипофиза. Одной из основных причин бесплодия являются гиперплазия и аденомы гипофиза. Кроме того, функциональные изменения в регуляции репродуктивной функции также связаны с нарушениями в секреции гипофизарных гормонов. Одним из маркеров этих нарушений является нарушенная секреция пролактина. В связи с этим ВОЗ рекомендовано использовать определение уровня пролактина в сыворотке (плазме) крови в качестве скринингового теста при первичном обследовании супругов, обращающихся в медицинские учреждения с проблемой бесплодия. До наступления менархе уровень пролактина в крови низкий и повышается в пубертатный период. В это время пролактин стимулирует развитие молочных желез. В течение менструального цикла уровень пролактина непостоянен. Он повышается в перiovуляторный период и во вторую половину лютеиновой фазы (его уровень может достигать 900 мМЕ/л), поэтому определять уровень пролактина рекомендуется в первую фазу цикла. Во время беременности и лактации секреция гормона возрастает. Кроме того, физиологическая гиперпролактинемия наблюдается при стрессовой ситуации и при физической нагрузке. Секреция пролактина осуществляется в определенном суточном ритме: максимум приходится на период сна (в 3-7 раз выше, чем в течение дня). В связи с этим очень важным является время отбора образцов крови для анализа. Увеличение концентрации пролактина отмечено при пролактинпродуцирующих опухолях гипофиза; идиопатических гиперпролактинемиях (симптомы: у женщин – нарушение менструаций, у мужчин – импотенция); гипофункции щитовидной железы; почечной недостаточности; приеме производных фенотиазина, галоперидола, имизина, эстрогенов, пероральных контрацептивов, гистаминных препаратов, опиатов; постинсулиновой гипогликемии. Уменьшение концентрации пролактина наблюдается при хирургическом

удалении гипофиза, лечении бромокриптином, приеме тироксина, рентгенотерапии.

1.3. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

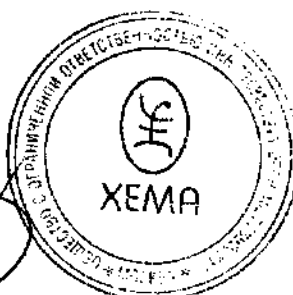
2.1. Принцип работы Набора. Определение пролактина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к пролактину человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации происходит связывание пролактина, содержащегося в образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к пролактину человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках.

Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации пролактина в исследуемом образце. Концентрацию пролактина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания пролактина в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе сыворотки, содержащие известные количества пролактина – 0; 100; 200; 1000; 2000 мМЕ/мл; концентрации пролактина в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (калибровочная проба 0 мМЕ/л – 2 мл, остальные по 0,8 мл каждая);
- **конъюгат**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием пролактина; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- **аналитический паспорт**;
- **Инструкция по применению Набора.**

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ХЕМА»
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ЛЕБЕДИН ЮРИЙ СТЕПАНОВИЧ



3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. **Специфичность** перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к пролактину человека с другими анализатами приведена в таблице

Аналит	Перекрестная реакция %
гормон роста	< 0,1
Плацентарный лактоген	<0,1
ЛГ	<0,1
ФСГ	<0,1

3.2. **Чувствительность.** Минимальная достоверно определяемая Набором «ПРОЛАКТИН-ИФА» концентрация пролактина в сыворотке (плазме) крови не превышает 10 мМЕ/л.

3.3. **Воспроизводимость.** Коэффициент вариации результатов определения содержания пролактина в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. **Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации пролактина предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 200 мМЕ/л

Процент «открытия» составляет 90-110%.

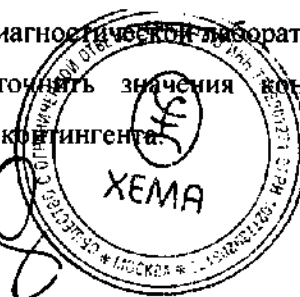
3.5. **Линейность.** Зависимость концентрации пролактина в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей пролактин, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 100-2000 мМЕ/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.6. **Клиническая проверка. Нормальные значения.**

Исследуемая группа	Единицы	
	мМЕ/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	60	560
Женщины		
Беременные:		
1-й триместр	-	2000
2-й триместр	-	6000
3-й триместр	-	10000
Фазы цикла:		
фолликулярная	60	600
лютеиновая	120	900
менопауза	40	550

В соответствии с требованиями *GLP* (Good Laboratory Practice, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клиничко-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» уточнять значения концентрации пролактина, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ЛЕБЕДИН ЮРИЙ СТЕПАНОВИЧ



4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение *«Правил 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.).

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

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;
- **термостат**, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C;
- **цилиндр мерный** вместимостью 500 мл;
- **вода дистиллированная**;
- **перчатки резиновые** или **пластиковые**;
- **бумага фильтровальная**.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25$ °C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре $+2-8$ °C не более 24 ч или при температуре минус 20 °C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации пролактина в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся невскрытыми стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8$ °C в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 2 сут. или при температуре +2-8 °C не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация пролактина в исследуемом образце превышает 2000 мМЕ/л, его следует дополнительно развести, используя, калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения!

7.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

7.3. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.4. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его при постоянном встряхивании в течение 60 мин при температуре 37 °C.

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 10-20 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °C) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.7. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок приобретет ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация пролактина в калибровочных пробах (мМЕд/л), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀). Для алгоритма обседа (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание пролактина в исследуемых образцах. Если используемый образец предразводили, умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (12 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

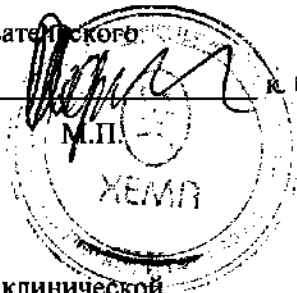
- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;
- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 °С не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 30 сут. и при температуре +2-8 °С не более 30 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение

Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов ПРОЛАКТИН-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА»  д.б.н. Д. С. Кострикин
11 января 2010 г.



«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО РМАПО Росздрава

д.м.н., профессор В. В. Долгов

