

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель Департамента
государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской техники МЗ РФ
_____ Р.У. Хабриев

«26» декабря 2000 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОЛАКТИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ИФА-пролактин-01)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета
по новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 9 от 23 октября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,
УТВЕРЖДЕННОЙ 17 июля 1998 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА-пролактин-01» предназначен для количественного определения пролактина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пролактин является полипептидным гормоном гипофизарного происхождения с молекулярной массой около 23000 Да. Определение уровня пролактина имеет диагностическое значение при нарушении функций половых желез у обоих полов. У женщин при гиперпролактинемии может отмечаться галакторея, аменорея или ряд других нарушений менструального цикла, в то время как мужчины могут страдать потерей либидо или импотенцией. Измерение циркулирующего пролактина важно как первичный тест на бесплодие.

Патологическая гиперпролактинемия имеет место при гипотиреозидизме, почечной недостаточности и у лиц с секретирующей пролактин опухолью гипофиза — пролактиномой.

Физиологическое повышение уровня пролактина имеет место во время беременности, лактации, сна и при физическом и эмоциональном стрессе.

1.3. Набор «ИФА-пролактин-01» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, бкалибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Примечание: В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «ИФА-пролактин-01» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к пролактину. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе мечено пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-пролактин-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация пролактина, содержащегося в исследуемом образце, и связывание с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-пролактин-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации пролактином. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству пролактина в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного конъюгата анти-пролактин-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация пролактина в определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к пролактину, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к пролактину» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Третьему международному стандарту ВОЗ 84/500, содержащие известные количества пролактина; концентрации пролактина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-пролактин-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием пролактина, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (по 0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к пролактину с гормоном роста, плацентарным лактогеном, тиреотропным, фолликулостимулирующим и лютеинизирующим гормонами человека.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения пролактина в одном и том же образце с использованием набора «ИФА-пролактин-01» не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации пролактина в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей пролактина, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет $\pm 10\%$.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» пролактина — соответствие измеренной концентрации пролактина предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация пролактина в сыворотке крови человека не превышает 10 мМЕ/л.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ИФА-пролактин-01 хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации пролактина 100000 мМЕ/л.

4.7. Клиническая проверка. Концентрация пролактина у 120 здоровых доноров находилась в интервале: для мужчин 105–540, для женщин 67–726 мМЕ/л.

4.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций пролактина, соответствующие нормальным.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

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

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

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

· спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;

- одноканальные пипетки с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- восьмиканальная пипетка, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- мерный цилиндр, позволяющий отмерять 200 мл;
- стеклянный стакан емкостью 300 мл;
- дистиллированная вода;
- фильтровальная бумага;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.3. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз. Например:

5мл БуфераР + 45мл дистиллированной воды

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. Конъюгат анти-пролактин-пероксидаза готов к использованию.

7.5. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.6. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. На последней странице приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;
C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;
D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;
E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;
F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;
G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;
H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме A1, A2 внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-пролактин-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки в дубликатах.

8.5. Инкубировать стрипы при встряхивании 1 час на термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Немедленно внести во все лунки по 100мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в течение 15–30минут в зависимости от степени развития окраски.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере 1–2 мин.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину B — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости B (ед.опт.плотн.) от концентрации пролактина в калибровочных пробах (мМЕ/л).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание пролактина в пробах по калибровочному графику.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор «ИФА-пролактин-01» должен храниться при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат анти-пролактин-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в течение всего срока годности при температуре +2...8°C.

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

9.3. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика, кроме этого рекомендуется определение концентрации пролактина в контрольной сыворотке.

9.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ИФА-пролактин-01» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14А, тел. (095) 120-60-95.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-пролактин-пероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП № 1, мкл	–	20	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	20	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	20	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	20	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	20	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	20	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	20	–
С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	20
Инкубация № 1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								

5-кратная промывка:	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x
промывочный буфер, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 мин.								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 мин.								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания:

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

С_x — анализируемые пробы;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»: зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Полынцевым.