

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОЛАКТИНУ МЕТОДОМ ІФА

## Prolactin Hormone (PRL) Test System

Кат. №: 725-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 4



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### 1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

**Використання за призначенням:** Кількісне визначення концентрації гормону пролактину в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

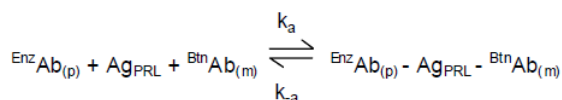
**2.0 ВСТУП** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Імуноферментний аналіз - ТИП 3

Реагенти, потрібні для імуноферментного аналізу, включають високо афінні та специфічні антитіла (мічені ферментом та іммобілізовані) з різними епітопами для розпізнавання, в надлишку, та нативний антиген. В даній процедурі відбувається зв'язування на поверхні лунок при взаємодії стрептавідину, яким покриті лунки та внесених ззовні біотинильованих моноклональних антитіл до Пролактину.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, фермент-мічених антитіл та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілами, без конкуренції та просторових заборудень, з формуванням розчинного сандвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється рівнянням:



$\text{EnzAb}_{(p)}$  = Біотинильоване моноклональне антитіло (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{PRL}}$  = нативний Антиген (змінна кількість)

$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Фермент-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Сандвіч-комплекс Антиген-антитіло

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

Одночасно комплекс відкладається на лунках через високо споріднену реакцію стрептавідину та біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

$\text{EnzAb}_{(m)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{Стрептавідин}_{\text{C.W.}} \Rightarrow \text{Іммобілізований комплекс}$

$\text{Стрептавідин}_{\text{C.W.}}$  = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

Після досягнення рівноваги фракція пов'язаних антитіл відділяється від незв'язаних фермент-антигену декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигена. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

## 4.0 РЕАГЕНТИ

### Матеріали, що постачаються

#### A. Калібратори Пролактину - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсної сироватки (стандартів) з концентраціями Пролактину 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) і 100 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

**Зауваження:** Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по третьому Міжнародному стандарту ВООЗ 84/500.

#### B. Ферментний реагент Пролактину - 13 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені афінно очищені мишачі моноклональні антитіла та біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### C. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### E. Субстрат А - 7 мл (мл) у флаконі

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### F. Субстрат В - 7 мл (мл) у флаконі

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### G. Стоп-розчин - 8 мл (мл) у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### H. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Зауваження 2:** Унікати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер.
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in Vitro  
Не для внутрішнього або зовнішнього використання  
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натщесерце.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні в низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (20-27 °C (°C)) до 60 днів.

2. **Робочий Субстратний розчин** - Стабільний протягом одного року  
Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C (°C).

**Зауваження 1:** Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

**Зауваження 2:** Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

**\*\*Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець\*\***

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл (µl) Ферментного реагенту Пролактину у кожную лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
5. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
7. Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожную лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожную лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожную лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630

нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Пролактину в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожную з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Пролактину в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації Пролактину в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.374 перетинає стандартну криву при 36.1 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1).

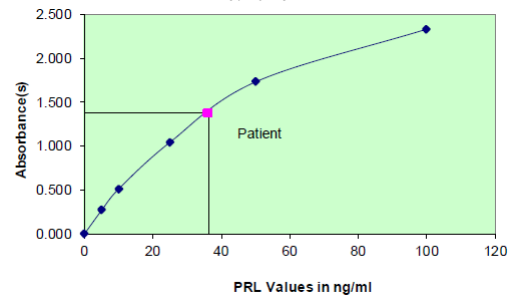
**Примітка:** Програмне забезпечення комп'ютера для обчислення даних, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Оптична щільність (ОЩ)	Середнє (ОЩ)	Значення (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	0.001	0.003	0
	B1	0.005		
Калібратор В	C1	0.278	0.269	5
	D1	0.260		
Калібратор С	E1	0.502	0.513	10
	F1	0.524		
Калібратор D	G1	1.065	1.045	25
	H1	1.024		
Калібратор E	A2	1.730	1.732	50
	B2	1.733		
Калібратор F	C2	2.359	2.333	100
	D2	2.307		
Контроль 1	E2	0.292	0.311	5.8
	F2	0.330		
Контроль 2	G2	0.715	0.714	14.9
	H2	0.713		
Зразок	A3	1.407	1.374	36.1
	B3	1.341		

\* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



Absorbance(s) - Абсорбція(i)  
PRL Values in ng/ml - Значення Пролактину в нг/мл  
Patient - Пацієнт

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Стандарту 100 нг/мл (ng/ml) має бути  $\geq 1.8$ .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

### 12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки пацієнтів з аномально високим рівнем пролактину можуть викликати хук-ефект, тобто парадоксальні результати з низькою абсорбцією. Якщо є підозра на це, розведіть зразок 1/100 «0» калібратором; повторіть аналіз (результат помножте на 100). Однак було виявлено, що значення до 3000 нг/мл (ng/ml) поглинають більше, ніж поглинання найвищого калібратора.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризику - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЕС СЕ/IV - щодо цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна запитувати електронною поштою на адресу [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитися досвідченими професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних досліджень». Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами. Для достовірних результатів тестування адекватний контроль та інші параметри повинні бути в межах перерахованих діапазонів та вимог до аналізу.
- Якщо тестові набори змінені, наприклад, шляхом змішування частин різних наборів, що може призвести до помилкових результатів тестування, або якщо результати неправильно інтерпретовані, **Monobind не несе відповідальності**.
- Якщо для інтерпретації результатів випробувань використовується комп'ютерний аналіз даних, обов'язковим є потрапляння передбачуваних значень для калібраторів у межі 10% від призначених концентрацій.
- Пацієнти, які отримують препарати з мишачими моноклональними антитілами для діагностики або терапії, можуть містити людські анти-мишачі антитіла (НАМА) і можуть виявляти помилково підвищені або депресивні значення при аналізі.
- Вагітність, лактація та прийом оральних контрацептивів можуть спричинити підвищення рівня пролактину.

- Такі препарати, як морфін, резерпін та психотропні препарати, підвищують секрецію пролактину.
- Оскільки концентрація гормону пролактину залежить від різних факторів, окрім гомеостазу гіпофіза, одного визначення недостатньо для оцінки клінічного стану.

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Для визначення очікуваних значень для тестової системи Пролактину AccuBind® ІФА було проведено дослідження нормальної дорослої популяції. Очікувані значення (95% довірчі інтервали) представлені в таблиці 1.

**Таблиця 1**  
Очікувані значення для тесту Пролактину в нг/мл (ng/ml)

Жінки	
Дорослі (N=70)	1.2-19.5
Постменопауза (N=10)	1.5-18.5
Чоловіки	
Дорослі (N=50)	1.8-17.0

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції «нормальних» людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, що тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність набору Пролактину всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

**ТАБЛИЦЯ 2**  
Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	5.4	0.23	4.3%
Рівень 2	20	18.4	0.67	3.6%
Рівень 3	20	40.8	2.78	6.8%

**ТАБЛИЦЯ 3**  
Точність між аналізами\* (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	5.8	0.57	9.8
Рівень 2	20	19.8	1.73	8.8
Рівень 3	20	43.8	2.97	6.8

\*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях.

### 14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.004 нг (ng)/лунку. Це еквівалентно зразку з концентрацією Пролактину 0.150 нг/мл (ng/ml) для даного набору. Межа виявлення визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл (ng/ml)) плюс 2σ (σ - стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

### 14.3 Достовірність (Порівняння методів)

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки від нормальних і вагітних жінок. Загальне число зразків було 65. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

**ТАБЛИЦЯ 4**  
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	15.5	y = 0.83 + 0.97 (x)	0.956
Референсний	14.8		

Було знайдено тільки незначну розбіжність даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

#### 14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл до Пролактину з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою пролактину, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
Гормон Пролактину	1.0000	---
Лютеїнізуючий Гормон (ЛГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Фолітролін (ФСГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Хоріонічний Гонадотропін (ХГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Тиреотропін (ТТГ)	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Гормон росту	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)



#### ВИРОБНИК

MONOBIND INC.  
100 North Pointe Dr.  
Lake Forest, CA 92630 - USA  
Phone: 949.951.2665  
Fax: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)

МОНОБАЙНД ІНК  
100 Норд Поїнт Драйв  
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США  
Тел.: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

