

Інструкція з використання
НАБОРУ РЕАГЕНТІВ « ДС-ІФА-ПРОЛАКТИН»
ТЕСТ-СИСТЕМА ІМУНОФЕРМЕНТНА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ
ПРОЛАКТИНА

1. Призначення

1.1. Набір реагентів « Дс-ІФА-Пролактин» призначений для кількісного визначення пролактину в сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

1.2. Пролактин - поліпептидний гормон з молекулярною масою близько 22500 Да, синтезований передньою часткою гіпофіза. Спостерігається зміна рівня пролактину протягом менструального циклу - підвищення в перiovуляторний період і в другу половину лютінової фази. Внаслідок цього рекомендується визначати концентрацію пролактину в першу фазу циклу. Секреція пролактину збільшується під час вагітності, лактації, при фізичному навантаженні й у стресових ситуаціях. У зв'язку з наявністю добових коливань концентрації пролактину, важливим є час забору крові для дослідження (під час сну рівень пролактину в кілька разів вище, ніж протягом дня).

Кількісне визначення рівня пролактину в крові має діагностичне значення як скринінговий тест при обстеженні подружніх пар із приводу безплідності. Патологічне збільшення рівня пролактину відзначається при наявності пролактиноми (пухлина гіпофіза), гіпофункції щитовидної залози, ниркової недостатності. Зниження концентрації пролактину спостерігається при хірургічному видаленні гіпофіза, прийомі тироксину, рентгенотерапії.

1.3. Набір розрахований на проведення аналізу в дублікатах в 48 пробах (40 невідомих проб, одна проба контрольної сироватки, шість каліброваних проб і одна проба для визначення оптичної щільності Тмб-Субстратного розчину) при одночасному використанні всіх стрипів планшета.

У випадку дробового застосування набору необхідно обов'язкове використання всіх каліброваних проб, набір може бути використаний протягом місяця після розкриття реагентів набору.

2. Характеристика набору

2.1. Принцип дії.

У наборі « Дс-ІФА-Пролактин» застосований «сендвіч»-варіант твердофазного ІФА. Для реалізації його використані два моноклона антитіла з різною специфічністю до двох доменів молекули пролактину: перші (не мічені) іммобілізовані на твердій фазі, другі (мічені пероксидазою хрину) входять до складу кон'югата. У лунках, при додаванні досліджуваного зразка й кон'югата анти-пролактин-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається іммобілізація пролактину, що втримується в досліджуваному зразку, і зв'язування його з кон'югатом. Кількість кон'югата, який зв'язався, прямо пропорційна кількості пролактину в досліджуваному зразку.

Під час інкубації із ТМБ відбувається фарбування розчину в лунках. Ступінь фарбування прямо пропорційна концентрації зв'язаного кон'югата анти-пролактин-пероксидаза. Після виміру оптичної щільності розчину в лунках на підставі каліброваного графіка розраховується концентрація пролактину в досліджуваних пробах.

2.2. Склад набору:

- імуносорбент - планшет полістироловий розбірний (12 стрипів по 8 лунок кожний) з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок моноклональними антитілами до пролактину, позначений «Імуносорбент» - 1 шт;

- кон'югат - моноклональні антитіла до пролактину людини, мічені пероксидазою хрину; прозорого або опалесцентного рожевого кольору рідина; позначена «Кон'югат» - 1 фл. (12,0 мл);

- калібровані проби, атестовані по 3 Міжнародному стандарту 84/500, що містять відомі кількості пролактину; прозорі або злегка опалесцентні ясно-жовтого кольору рідини; калібрований матеріал може відрізнитися від заявленого за значеннями концентрації пролактину (мМЕ/мл), значення концентрацій пролактину в каліброваних пробах зазначені на етикетках флаконів і в аналітичному паспорті якості, маркіровані:

«Калібратор 0» (0 мМЕ/мл) - 1 фл. (2,0 мл);

«Калібратор 1» (100 мМЕ/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калібратор 2» (200 мМЕ/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калібратор 3» (500 мМЕ/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калібратор 4» (1000 мМЕ/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калібратор 5» (2000 мМЕ/мл) - 1 фл. (0,5 мл).

- контрольна сироватка з відомим змістом пролактину; прозора або злегка опалесцентного ясно-жовтого кольору рідина; значення концентрації пролактину в сироватці зазначено на етикетці флакона й в аналітичному паспорті якості, позначена «Контрольна сироватка» - 1 фл. (0,5 мл);

- промивний розчин, концентрат; прозора або злегка опалесцентного, безбарвна або ясно-жовтого кольору рідина, припустиме утворення осаду, що повністю розчиняється при температурі від 35 до 39 °С и струшуванні; позначений «ПР (концентрат х 25)» - 1 фл. (50,0мл);

- Тмб-субстратний розчин; прозора безбарвна рідина; позначена « Тмб-Субстратний розчин» - 1 фл. (12,0 мл);

- сірчана кислота в концентрації 0,2 моль/л; прозора безбарвна рідина; позначена «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл);

- бланк для побудови каліброваної кривої - 1 шт;

- інструкція із застосування - 1 шт.

Додатково в комплект поставки можуть бути включені:

-кришка до полістиролових 96-ямкових планшетів;

-одноразові наконечники;

-пластикова ванночка для рідких реагентів;

-пластикова скріпка для закривання пакета з імуносорбентом.

3. Аналітичні й діагностичні характеристики набору

3.1. Чутливість. Мінімальна вірогідно обумовлена набором концентрація пролактину в сироватці крові людини становить 10 мМЕ/л.

3.2. Специфічність. Для визначення крос-реактивності в зразок сироватки з відомою концентрацією пролактину додавали крос- реагенти, зазначені в таблиці №1.

Таблиця 1

Крос-Реагент	Крос-Реактивність, %
Пролактин	100
ФСГ	0,9
ЛГ	0,2

ХГч	0,02
	0

- 3.3. Коефіцієнт варіації результатів визначення пролактину в тому самому зразку з використанням набору не перевищує 8%.
- 3.4. Лінійність. Залежність концентрації пролактину в зразках сироватки крові має лінійний характер у діапазоні концентрацій каліброваних проб №1 - 5. Значення «лінійності» повинне перебувати в межах від 90 до 110%.
- 3.5. Точність. Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» пролактину - відповідність обмірюваної концентрації пролактину запропонованої в пробі, отриманої шляхом змішування рівних обсягів каліброваної проби №2 і контрольної сироватки. Відсоток відкриття становить від 90 до 110%.
- 3.6. Клінічна перевірка. Концентрацію пролактину вимірювали в сироватці крові, узятій з 9 до 11 год в 120 здорових людей у віці від 21 до 40 років.

Група	Розкид концентрацій, мМЕ/л
Жінки	Від 74 до 745
Чоловіки	Від 45 до 320

3.7. Рекомендується в кожній лабораторії при використанні набору уточнити значення концентрацій пролактину, що відповідають нормальним значенням для конкретної території.

4. Запобіжні заходи

- 4.1. Потенційний ризик застосування набору - клас 2а.
- 4.2. Усі компоненти набору у використовуваних концентраціях є нетоксичними.
- 4.3. При роботі з набором варто дотримуватися «Правил пристрою, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму й особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР» (Москва, 1981 р.).
- 4.4. Стоп-реагент являє собою 0,2 М розчин сірчаної кислоти. Уникати розбризкування й потрапляння на шкіру й слизувати. У випадку потрапляння розчину стоп-реагенту на шкіру й слизувати необхідно промити уражену ділянку великою кількістю

проточної води.

4.5. При роботі з набором варто надягати одноразові гумові або пластикові рукавички, тому що досліджувані зразки сироваток крові є потенційно інфікованим матеріалом, у якому тривалий час можуть зберігатися збудники ВІЛ, парентеральних вірусних гепатитів і інших інфекційних захворювань.

4.6. Хімічний посуд і устаткування, які використовуються в роботі з набором, повинні бути відповідним чином позначені й зберігатися окремо.

4.7. Забороняється прийом їжі, використання косметичних засобів і паління в приміщеннях, призначених для роботи з наборами.

5. Устаткування й матеріали, необхідні при роботі з набором:

- спектрофотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну щільність розчину в лунках планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостатуємий шейкер, що дозволяє робити струшування зі швидкістю від 500 до 800 об/хв при $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- пристрій для промивання планшетів (вошер);
- термостат для інкубації при температурі $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- дозатори піпеткові напівавтоматичні одноканальні зі змінюваним обсягом відбору рідин: на 5-50 мкл; на 40-200 мкл; на 200-1000 мкл; на 1000-5000 мкл із наконечниками;
- дозатор піпетковий напівавтоматичний восьми канальний, що дозволяє відбирати обсяги рідини до 300 мкл, з наконечниками;
- циліндр мірний (200 мл, 500 мл);
- склянка скляна (500 мл);
- вода дистильована;
- папір фільтрувальний лабораторний;
- рукавички гумові або пластикові.

6. Аналізовані зразки сироваток крові людини

Для виключення помилкових результатів не можна піддавати досліджувані зразки термоінактивуванню, необхідно відбирати й зберігати їх в умовах, що запобігають бактеріальний ріст. Неприпустиме використання зразків з додаванням азиду натрію як

консерванту! Кожний зразок досліджуваної сироватки варто відбирати новим наконечником! Відібрані зразки зберігати при температурі від 2 до 8 °С не більше 3-х діб. Більше тривале зберігання припустиме при температурі не вище мінус 20 °С (зразки можуть піддаватися заморожуванню й відтаванню не більше 1 разу). Не можна використовувати зразки з бактеріальним ростом, вираженим гемолізом і гіперліпідемією. Зразки сироватки крові, що містять агрегати або осад, необхідно освітляти центрифугуванням при 1000-2000 об/хв протягом 15 хв при температурі від 4 до 8 °С.

7. Підготовка реагентів для аналізу

7.1. Не можна використовувати реагенти з наборів різних серій або змішувати їх у процесі готування розчинів, а також використовувати реагенти після закінчення терміну їхньої придатності!

Перед використанням всі реагенти набору витримати 30 хв при кімнатній температурі (від 18 до 24 °С).

7.2. Імуносорбент. **Увага: щоб уникнути конденсації вологи усередині лунок необхідно витримати імуносорбент при кімнатній температурі (від 18 до 24 °С) у закритому пакеті не менш 30 хвилин!**

Розкрити фольгований пакет, відступивши 1,0см від краю пакета. Вийняти з пакета рамку й необхідну кількість стрипів, вставити стрипи в рамку.

7.3. ПР - робочий промивний розчин. Уміст флакона з концентратом ПР ретельно перемішати. Для готування робочого ПР необхідну кількість концентрату промивного розчину відібрати в окрему ємкість і додати відповідну кількість води дистильованої (див. табл. №2). Отриманий розчин ретельно перемішати.

7.4. Кон'югат - готовий до застосування. Зберігання: після розкриття флакона кон'югат, що залишився невикористаним, зберігати у флаконі, щільно закритому гвинтовою кришкою, протягом місяця при температурі від 2 °С до 8 °С.

7.5. Калібровані проби - готові до застосування.

7.6. Контрольна сироватка, готова до застосування.

7.7. Тмб-субстратний розчин - готовий до застосування.

7.8. Стоп-реагент - готовий до застосування.

Таблиця №2

Витрата реагентів набору залежно від кількості використовуваних стрипів

	Робочий промивний розчин		Кон'югат (мл)	ТМБ-Субстратний розчин(мл)
	ПР (конц х25) (мл)	Вода дистильована (мл)		
2	5	120	2,0	2,0
3	10	240	3,0	3,0
4	15	360	4,0	4,0
5	20	480	5,0	5,0
6	20	480	6,0	6,0
7	20	480	7,0	7,0
8	20	480	8,0	8,0
9	20	480	9,0	9,0
10	20	480	10,0	10,0
11	20	480	11,0	11,0
12	20	480	12,0	12,0

8. Проведення аналізу.

8.1. Калібровані проби й контрольну сироватку рекомендується вносити за наступною схемою:

у лунки іммуносорбента А-1, А-2 дозатором піпетковим внести по 25 мкл «Калібратора 0», у лунки В-1, В-2 - по 25 мкл «Калібратора 1», у лунки С-1, С-2 - по 25 мкл «Калібратора 2», у лунки D-1, D-2 - по 25 мкл «Калібратора 3», у лунки Е-1, Е-2 - по 25 мкл «Калібратора 4», у лунки F-1, F-2 - по 25 мкл «Калібратора 5» контрольної сироватки. У лунки G1, G2 - по 25 мкл контрольної сироватки. Лунки Н1 і Н2 залишити для виміру оптичної щільності Тмб-Субстратного розчину.

В інші лунки у двох повторях внести по 25 мкл досліджуваних зразків сироваток крові.

Увага! Час внесення зразків не повинен перевищувати 10 хв!

8.2. В усі лунки, крім Н1 і Н2, внести по 100 мкл кон'югата, стрипи планшета закрити кришкою й інкубувати 60 хвилин при температурі $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ у вологій камері в

термостаті або на шейкері при струшуванні зі швидкістю від 500 до 800 об/хв протягом 30 хв при температурі $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

Для створення вологої камери планшет закрити кришкою, на яку покласти змочену водою фільтрувальний папір, планшет помістити в поліетиленовий пакет, після чого край пакета загорнути донизу.

8.3. Після закінчення зазначеного часу вміст лунок видалити за допомогою вошера (або багатоканальної піпетки) у ємкість для збору інфікованого матеріалу, імуносорбент промити 5 разів робочим ПР, заливаючи його до країв лунок (не менш 300 мкл у лунку) і видаляючи промивний розчин за допомогою вошера (або багатоканальної піпетки) у ємкість для збору інфікованого матеріалу. По закінченні промивання ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в переверненому положенні по фільтрувальному паперу. Не допускати залишку рідини в лунках планшета.

8.4. В усі лунки відмитого планшета внести по 100 мкл ТМБ- Субстратного розчину й витримати протягом від 20 до 30 хв у захищеному від світла місці при температурі від 18 до 24 °С.

8.5. Реакцію зупинити додаванням в усі лунки планшета по 150 мкл стоп-реагенту, струснути стріпи на шейкері протягом від 10 до 15 секунд і провести облік результатів.

9. Реєстрація результатів

Реєстрацію результатів проводити спектрофотометрично при довжині хвилі: 450 нм із налагодженням приладу по «повітрю».

Бажано використовувати програму спектрофотометра, що дозволяє віднімати величину оптичної щільності (ОЩ) у лунках з «Калібратором 0» (A1-A2) зі значень ОЩ всіх інших лунок, якщо фотометр не дозволяє віднімати величину ОЩ лунок A1-A2, то для розрахунків концентрацій варто використовувати величину різниці ОЩ зразка - ОЩ A1-A2, де ОЩ зразки - середнє значення ОЩ у лунках, що містять калібровані або досліджувані проби, ОЩA1-A2 - середнє значення ОЩ лунок A1-A2.

10. Облік результатів

Реакцію варто враховувати, якщо середнє значення ОЩ у лунках з контролем субстрату (H1 і H2) - не більше 0,1.

Необхідно побудувати калібрований графік по середніх величинах ОЩ «Калібратора

0»; «Калібратора 1»; «Калібратора 2»; «Калібратора 3»; «Калібратора 4», «Калібратора 5» .
На бланку для побудови каліброваної кривої по осі абсцис X відкладають відповідні значення концентрації пролактину, вираженої в мМЕ/л, по осі ординат Y відкладають середні значення ОЩ каліброваних проб. По отриманих крапках будують калібровану криву.

Контрольна сироватка служить для перевірки точності й вірогідності результатів. Отримані величини концентрацій пролактину в зразках вважати достовірними, якщо обчислене за графіком значення концентрації пролактину в контрольному зразку попадає в межі, зазначені на етикетці флакона.

11. Умови зберігання й експлуатації набору

11.1. Набір реагентів повинен зберігатися в упакованні підприємства-виготовлювача при температурі від 2 до 8 °С у захищеному від світла місці протягом усього терміну придатності. Термін придатності набору - 18 місяців.

11.2. Транспортування набору реагентів проводити при температурі від 2 до 8 °С. Припустимо транспортування при температурі від 9 до 20 °С не більше 10 діб.

11.3. У випадку дробового використання компоненти набору необхідно зберігати в такий спосіб:

- Імуносорбент - пакет з невикористаними стріпами й силікагелем ретельно герметизувати. Після першого розкриття пакета імуносорбент стабільний протягом 1 місяця при зберіганні при температурі від 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - після розкриття флакона ПР (концентрат х 25), що залишився невикористаним, зберігати у флаконі, щільно закритому гвинтовою кришкою, протягом терміну придатності набору при температурі від 2 до 8 °С;

- Робочий промивний розчин, підготовлений до використання, зберігати не більше 3х діб при температурі від 2 до 8 °С.

- Кон'югат - після розкриття флакона кон'югат, що залишився невикористаним, зберігати у флаконі, щільно закритому гвинтовою кришкою, протягом місяця при температурі від 2 °С до 8 °С.

- Калібровані проби - після розкриття флакона калібровані проби, що залишилися невикористаними, зберігати у флаконах, щільно закритих гвинтовими кришками протягом

місяця при температурі від °2 С до °8 С.

- Контрольна сироватка - після розкриття флаконів контрольну сироватку, що залишилася невикористаною, зберігати у флаконі, щільно закритому гвинтовою кришкою, протягом місяця при температурі від 2 до °8 С.

- Тмб-субстратний розчин - після розкриття флакона Тмб-Субстратний розчин, що залишився невикористаним, зберігати у флаконі, щільно закритому гвинтовою кришкою, протягом місяця при температурі від 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент - після розкриття флакона Стоп-реагент, що залишився невикористаним, зберігати у флаконі, щільно закритому гвинтовою кришкою, протягом терміну придатності набору при температурі від 2 до 8 °С.

-

- **Офіційний постачальник в Україні:**

- ТОВ “Діагностичні системи Україна”, Україна, 04107, м. Київ, вул. Багговутівська, 8/10,

- **Виробник;**

- **ТОВ НВО “Діагностичні системи”**, Росія , 603094, м. Нижній Новгород, вул. Комінтерна, 47