

Код ОКП 939817

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»

И. Е. Колосов

«25» 2005 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Пролактин»
Тест-система иммуноферментная для количественного определения
пролактина

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Пролактин» предназначен для количественного определения пролактина в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Пролактин – полипептидный гормон с молекулярной массой около 22500 Да, синтезируемый передней долей гипофиза. Наблюдается изменение уровня пролактина в течение менструального цикла – повышение в перiovуляторный период и во вторую половину лютеиновой фазы. Вследствие этого рекомендуется определять концентрацию пролактина в первую фазу цикла. Секреция пролактина увеличивается во время беременности, лактации, при физической нагрузке и в стрессовых ситуациях. В связи с наличием суточных колебаний концентрации пролактина, важным является время забора крови для исследования (во время сна уровень пролактина в несколько раз выше, чем в течение дня).

Количественное определение уровня пролактина в крови имеет диагностическое значение как скрининговый тест при обследовании супружеских пар по поводу бесплодия. Патологическое увеличение уровня пролактина отмечается при наличии пролактиномы (опухоль гипофиза),

гипофункции щитовидной железы, почечной недостаточности. Снижение концентрации пролактина наблюдается при хирургическом удалении гипофиза, приеме тироксина, рентгенотерапии.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех калибровочных проб, набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

В наборе «ДС-ИФА-Пролактин» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклона антител с разной специфичностью к двум доменам молекулы пролактина: первые (немеченные) иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-пролактин-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация пролактина, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству пролактина в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации связанного конъюгата анти-пролактин-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация пролактина в исследуемых пробах.

2.2. Состав набора:

- иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к пролактину, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

- конъюгат - моноклональные антитела к пролактину человека, меченные пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость; маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12,0 мл);

- калибровочные пробы, аттестованные по 3 Международному стандарту 84/500, содержащие известные количества пролактина; прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости; калибровочный материал может отличаться от заявленного по значениям концентрации пролактина (мМЕ/мл), значения концентраций пролактина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества, маркированы:

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

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

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

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

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

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

- контрольная сыворотка с известным содержанием пролактина; прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость; значение концентрации пролактина в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (0,5 мл);

- промывочный раствор, концентрат; прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании; маркирован «ПР (концентрат x 25)» - 1 фл. (50,0 мл);

- ТМБ-Субстратный раствор; прозрачная бесцветная жидкость; маркирован «ТМБ-Субстратный раствор» - 1 фл. (12,0 мл);
- серная кислота в концентрации 0,2 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость; маркирована «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл);
- бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт;
- инструкция по применению – 1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами;
- одноразовые наконечники;
- пластиковая ванночка для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация пролактина в сыворотке крови человека составляет 10 мМЕ/л.

3.2. Специфичность. Для определения кросс-реактивности в образец сыворотки с известной концентрацией пролактина добавляли кросс-реагенты, указанные в таблице №1.

Таблица №1

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
Пролактин	100
ФСГ	0,9
ЛГ	0,2
ХГч	0,02
ТТГ	0

3.3. Коэффициент вариации результатов определения пролактина в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации пролактина в образцах сыворотки крови имеет линейный характер в диапазоне концентраций

калибровочных проб №1 – 5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» пролактина – соответствие измеренной концентрации пролактина предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №2 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию пролактина измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 120 здоровых людей в возрасте от 21 до 40 лет.

Группа	Разброс концентраций, мМЕ/л
Женщины	От 74 до 745
Мужчины	От 45 до 320

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций пролактина, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной 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.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. исследуемые образцы сывороток крови являются потенциально инфицированным материалом, в котором длительное время могут сохраняться возбудители ВИЧ, парентеральных вирусных гепатитов и других инфекционных заболеваний.

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

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

5. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;

- устройство для промывания планшетов (вошер);

- термостат для инкубации при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;

- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;

- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;

- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);

- стакан стеклянный (500 мл);

- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная лабораторная;

- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов с добавлением азида натрия в качестве консерванта! Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 24 °С).

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (от 18 до 24 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

7.3. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды

дистиллированной (см. табл. №2). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Конъюгат – готов к применению. Хранение: после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.5. Калибровочные пробы - готовы к применению.

7.6. Контрольная сыворотка, готова к применению.

7.7. ТМБ-Субстратный раствор - готов к применению.

7.8. Стоп-реагент – готов к применению.

лица № 2

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

	Рабочий промывочный раствор		Конъюгат (мл)	ТМБ-Субстратный раствор (мл)
	ПР (конц x25) (мл)	Вода дистиллированная (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. Проведение анализа.

8.1. Калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме:

в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 25 мкл «Калибратора 0», в лунки В-1, В-2 - по 25 мкл «Калибратора 1», в лунки С-1, С-2 - по 25 мкл «Калибратора 2», в лунки D-1, D-2 – по 25 мкл «Калибратора 3», в лунки Е-1, Е-2 - по 25 мкл «Калибратора 4», в лунки F-1, F-2 - по 25 мкл «Калибратора 5». контрольной сыворотки. В лунки G1, G2 – по 25 мкл контрольной сыворотки. Лунки H1 и H2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки в двух повторах внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 мин!

8.2. Во все лунки, кроме Н1 и Н2, внести по 100 мкл конъюгата, стрипы планшета закрыть крышкой и инкубировать 60 минут при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ во влажной камере в термостате или на шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Для создания влажной камеры планшет закрыть крышкой, на которую положить смоченную водой фильтровальную бумагу, планшет поместить в полиэтиленовый пакет, после чего края пакета завернуть вниз.

8.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

8.4. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать в течение от 20 до 30 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

8.5. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение от 10 до 15 секунд и провести учет результатов.

9. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны: 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

Желательно использовать программу спектрофотометра, позволяющую вычитать величину оптической плотности (ОП) в лунках с «Калибратором 0» (А1-А2) из значений ОП всех остальных лунок, если фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок А1-А2, то для расчетов концентраций следует использовать величину разности ОП образца – ОПА1-А2, где ОП образца – среднее значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, ОПА1-А2 – среднее значение ОП лунок А1-А2.

10. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем субстрата (Н1 и Н2) - не более 0,1.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»; «Калибратора 4», «Калибратора 5» . На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации пролактина, выраженной в мМЕ/л, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций пролактина в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации пролактина в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 13 месяцев.

11.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 °С до 8 °С.

- Калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении месяца при температуре от 2 °С до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флаконов оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом

винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

11.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству


Г. А. Полянская

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»




Профессор Долгов В.В.
2008.

Подпись <i>В.В. Долгова</i>
удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись: <i>Долгов</i> 25.01.08