



## Набор ИФА для определения в человеческой сыворотке ПРОЛАКТИНА

**Кат. Номер** : E-PRO-1P  
**Количество** : 96  
**Производитель** : Dima Diagnostika (Германия)

Методика от 11-2005

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

### ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- Длина волны** - фильтр измерения: 450 нм
- Время инкубации** - 55 минут (15/30/10)
- Ферментный конъюгат** - HRP (Пероксидаза Хрена)
- Субстрат** - ТМВ (3,3',5,5' - Тетраметилбензидин)
- Образец** - сыворотка или слеза
- Стабильность образцов** - неразбавленных: 2 дня при 2-8°C; для более длительного хранения при -20 °С
- Диапазон калибровки** - 0 – 200 нг/мл
- Чувствительность** - 1.0 нг/мл
- Срок годности и стабильность набора:**  
Компоненты набора – см. срок годности на этикетке.

### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микропланшет**, 12x6x8 **полосок** (с разделяющимися лунками); 96 лунок, покрытых анти-моноклональным ЛГ. **Готов к использованию.**
2. **Калибраторы** (5), **5 флаконов** по 0,2 (0,1) мл. Концентрации: 0; 5; 20; 75 и 200 нг/мл. **Готовы к использованию.**
3. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон 12 (6) мл анти-моноклонального Пролактина HRP конъюгата. **Готов к использованию.**
5. **Раствор Субстрата**, 1 флакон ТМВ-субстрата, 12 (6) мл, 0,25 г/л. **Готов к использованию.**
6. **Стоп Раствор**, 1 флакон серной кислоты 0,15 моль/л, 12 (6) мл. **Готов к использованию.**

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Неионизированная или дистиллированная вода.
2. Объемные пробирки и подставки.
3. Подставки для промывки
4. Микропипетки от 25 до 1000 мкл.
5. Многоканальная пипетка.
6. Этаповый координатный стол.
7. Микропланшетный фотометр, способный проводить измерения при (450 нм ± 10 нм). Если доступен фотометр с двойной длиной волны, контрольный фильтр нужно установить на 600-690 нм.
8. Автоматический микропланшетный вошер, способный к распределению 300 мкл.

### ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Человеческий пролактин (лактогенный гормон), что секретируется у мужчин и женщин передней долей гипофиза. Пролактин является одноцепным полипептидным гормоном с молекулярным весом около 23,000 дальтон. Синтезирование и освобождения пролактина связаны с нейроэндокринным контролем, первично с пролактин рилизинг фактором и пролактин ингибитор фактором. У женщин нормально уровень пролактина несколько выше, чем у мужчин, очевидно, есть его эстроген-ассоциированный рост в пубертном периоде и соответствующее уменьшение в период менопаузы. Первичной функцией пролактина является стимулирование развития грудной залозы и лактации. Пролактин также подавляет гонадальную функцию. Во время беременности уровень пролактина увеличивается в 10-20 раз от нормальных значений и уменьшается до нормального уровня на 3-4 неделю после родов. У матерей, кормящих грудью, наблюдается высокий уровень пролактина и его концентрация возвращается до нормального уровня через несколько месяцев. Определения концентрации пролактина используется в диагностике гипоталамично-гипофизарных расстройств. Микроаденомы (маленькие гипофизарные опухоли) могут вызывать гиперпролактинемиию, которая иногда ассоциируется с мужской импотенцией. Высокий уровень пролактина часто ассоциируется с галактореей и аменореей. Уровень пролактина увеличивается эстрогенами, тиреотропным рилизинг гормоном (ТРГ) и другими лекарствами, которые имеют допаминергичный механизм. Уровень пролактина увеличивается при ренальных заболеваниях и гипотиреодизме, а также в некоторых случаях при стрессах, физических нагрузках и гипогликемии. К тому же, пролактин освобождается эпизодически и показывает суточную вариацию. Это нужно принимать во внимание при интерпретации слегка повышенной концентрации пролактина. Уровень

пролактина также может увеличиваться под действием лекарств, таких как хлорпромазин, резерпин и может понижаться под действием бромоциптана и L-допа.

### ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА

Данный ELISA анализ – непрямой твердофазный иммуноанализ, основанный на принципе сэндвича.

Микролуночки покрыты анти-моноклональным пролактином, с последовательным блокированием неактивных краев, чтобы сократить неспецифическое связывание.

**Этап 1** Антигены пролактина, присутствующие в калибраторах и образцах пациентов привязываются к покрытому антителу.

**Этап 2** Комплекс антиген-антитело вступает в реакцию с ферментом (HRP), меченным анти-моноклональным конъюгатом пролактина, который ведет к разделению моноклонального антигена пролактина между антителом твердой фазы и ферментным конъюгатом.

**Этап 3** Фермент преобразовывает добавленный субстрат (ТМВ), создав цветной раствор.

**Этап 4** Интенсивность изменения цвета, которое пропорционально концентрации антител в образцах считается микропланшетным фотометром при 450 нм. Результаты выражены в нг/мл.

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна установить свои собственные стандартные диапазоны, основанные на пациентах.

Значения пролактина сыворотки или плазмы определены в следующих диапазонах:

Образец	Диапазон (нг/мл)
Мужчина	4.0 – 12.0
Женщина: менструальный цикл 1	2 – 22.0
Менопауза	0.7 – 17

### РЕАГЕНТЫ

#### Хранение

- Хранить все реагенты при 2° - 8°C. Не замораживать!

#### Подготовка

- Покрытые микролуночные полоски только для одноразового использования.
- Калибраторы, раствор субстрата, ферментный конъюгат и стоп раствор готовы к использованию и не нуждаются в разбавлении.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. Избегайте контакта с ТМВ (3,3',5,5'-Тетраметилбензидином). Если ТМВ контактирует с кожей, промойте ее тщательно с водой и мылом.
2. Стоп раствор содержит серную кислоту. Если раствор контактирует с кожей, смойте его тщательно водой и обратитесь за медицинской помощью.
3. Избегайте контакта между буферизованным раствором пероксидазы и легко окисляющимися материалами; высокая температура может вызвать самовоспламенение.
4. **ВНИМАНИЕ:** Не существует методов тестирования, на 100% гарантирующих отсутствие компонентов вируса Гепатита В, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV), или других инфекций. Поэтому все продукты, содержащие компоненты человеческой крови должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Поэтому при работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности, установленные в лабораторной практике.
5. Немедленно после использования закройте реагенты крышками. Не путайте крышки от реагентов.
6. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид натрия, не должны использоваться в ферментной реакции.
7. Только для диагностики ин-витро.
8. Не используйте в исследовании компоненты из наборов разных партий.

### ЗАБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Только образцы **сыворотки или плазмы** необходимо использовать в этой процедуре. Не нужно пациентам сдавать кровь натощак, и не нужны никакие специальные подготовки.
2. Высокогемолизированные, липемические и биологически зараженные образцы, могут мешать проведению анализа и не должны использоваться. Ни билирубин, ни гемолиз не имеют существенного влияния на процедуру.
3. Образцы необходимо хранить максимум **до 2 дней** при 2-8°C. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить до -20°C до исследования. Образцы с концентрацией более 200 мЕд./мл необходимо разбавить разбавителем образца.
4. См. **Подготовка Образцов.**

**ПРОЦЕДУРА****Процедурные замечания**

1. Перед исследованием все реагенты и образцы должны иметь комнатную температуру. Все реагенты перемешивать без образования пены.
2. После начала теста все этапы должны быть завершены без перерывов.
3. Для каждой пробы использовать новые одноразовые наконечники пипеток.
4. Абсорбция исходит из времени инкубации и температуры. До начала исследования рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить требуемое количество лунок, и т.д., чтобы пройти все этапы исследования без остановки.

**Подготовка образцов**

Обычно нет необходимости в разбавлении; разбавьте образцы с концентрациями выше 200 нг/мл стандартом 1:1.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

1. Используйте протокол размещения образцов в лунках (см. Рисунок ниже), где используются **5 калибраторов** (стандартов) (А-Е) и **1 бланк**. Пользователь может провести на выбор анализ в паре:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Кал.	Конц. нг/мл
a	B	SD	P3										SA	0
b	SA	SE	P4										SB	5
c	SA	SE	P4										SC	20
d	SB	P1	P..										SD	75
e	SB	P1	P..										SE	200
f	SC	P2												
g	SC	P2												
h	SD	P3												

2. Возьмите требуемые лунки из сумки и верните неиспользованные полоски в запечатанную сумку в холодильнике. Безопасно разместите микролунки в дополнительном держателе.
3. Пипеткой внесите по **10 мкл калибратора** и **10 мкл образца** в лунки. Инкубируйте **15 минут при комнатной температуре**.
4. Добавьте **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку планшета кроме бланка, накройте планшет и инкубируйте **30 минут при комнатной температуре**.
5. Внесите **приблиз. 300 мкл** дистиллированной воды, декантируйте или аспирируйте содержимое лунок. Повторите процедуру **4 раза, в сумме – 5 раз**.
6. Внесите **100 мкл раствора субстрата** в каждую микролунку в том же порядке и времени как для ферментного конъюгата и бланка.
7. Инкубируйте **10 минут** при комнатной температуре в темноте.
8. Добавьте **100 мкл стоп раствора** в каждую микролунку, в том же порядке и времени как для раствора субстрата.
9. Используя микропланшетный фотометр, считайте абсорбцию каждой микролунки при **450 нм относительно бланка**. Образовавшийся цвет стабилен, по крайней мере 30 мин. Считайте оптическую плотность в течении этого времени.

**ОЦЕНКА АНАЛИЗА**

Средняя абсорбция и процентное соотношение.

1. Вычислите средние показатели абсорбции (Em), соответствующие единичным точкам стандартной кривой и показатели каждого образца.
2. Отнимите значение средней абсорбции нулевого стандарта от значений средней абсорбции стандартов и образцов.
3. Нарисуйте стандартную кривую на графопостроительной бумаге выводя значения абсорбции стандарта против соответствующей концентрации ЛГ.
4. Считайте концентрации ЛГ калибраторов и образцов.

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

Анализ не должен проводиться с высокогемолизированными, биологически загрязненными или липемическими образцами. Этот метод нужно использовать только для анализа образцов человеческой сыворотки.

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****Чувствительность**

Минимально определенная концентрация человеческого пролактина в данном анализе составляет 1,0 нг/мл.

**Специфичность (перекрестная реактивность)**

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность:

hProlactin	100.0 %
hGH	< 0.2 %
HPL	< 0.1 %

**Точность****Внутрирестовое отклонение**

Образец	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Среднее пролактина (нг/мл)	7,5	28,2	64,2
Стандартное отклонение	0,45	1,8	4,25
Коэффициент вариации (%)	6,1	6,4	6,9

**Междустовое отклонение**

Образец	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Среднее пролактина (нг/мл)	7,7	27,4	59,3
Стандартное отклонение	0,51	2,07	5,15
Коэффициент вариации (%)	6,6	7,6	8,7

**Восстановление**

Среднее восстановление составило 98,2 % по соотношению к первичным концентрациям.

Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
9,4	8,9	94,7
15,2	14,7	96,7
26,6	24,7	92,8
57,5	60,3	104,8
98,3	104,9	106,7

**Линейность**

В линейном исследовании были последовательно разбавлены нулевым стандартом два образца пациентов. Среднее восстановление составило 102,1%.

Пациент	Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
<b>1</b>		54.4	
Разбавл. 1 / 2	27.2	28.6	105.1
Разбавл. 1 / 4	13.6	13.0	95.6
Разбавл. 1 / 8	6.8	7.2	105.9
<b>2</b>		38.8	
Разбавл. 1 / 2	19.4	18.5	95.3
Разбавл. 1 / 4	9.7	9.9	102.1
Разбавл. 1 / 8	4.9	5.3	108.1

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

В этом анализе эффект «крюка» или «петли» не был обнаружен в пределах до 4000 нг/мл пролактина.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)