



## Набір ІФА для визначення в сироватці людини ПРОЛАКТИНУ

Каталог. № : KP8IW  
Кількість : 96  
Виробник : Radim (Італія)

Методика від 07-04-2005

Увага: основою при проведенні дослідження є оригінал інструкції.

### ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

#### ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір базується на імуноферментометричному аналізі (ЕІМА). В ньому використовуються два різні моноклональні антитіла до пролактину, одними покриті лунки, а інші кон'юговані до пероксидази хрому (HRPO). Впродовж інкубації пролактин в калібраторах і зразках водночас зв'язується з двома моноклонами, утворюючи комплекс «сендвіч». Після цієї інкубації весь незв'язаний матеріал видаляється циклом аспірації/промивання. Залишкова ферментативна активність в лунках прямо пропорційна концентрації пролактину в калібраторах і зразках, та відображатиметься при інкубації твердої фази з розчином хромогену (ТМБ) в субстратному буфері. Колориметричне зчитування здійснюється за допомогою спектрофотометра при 450 нм.

#### РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ: ПРИГОТУВАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- реагентів достатньо для 96 лунок
- зберігати набір при 2-8°C
- термін придатності кожного реагента вказаний на етикетці флакону.

- Покритий мікропланшет:** 96 лунок, покритих моноклональними антитілами до пролактину. Невикористані лунки необхідно зберігати при 2-8°C в наявному поліетиленовому пакеті та герметично закритими.
- Калібратори:** 6 фл. пролактину в основі сироватки, ліофілізовані. Концентрації: 0, 5, 10, 20, 50 та 150 нг/мл. Консервант: неоміцин і тімеросал (<0,05%). Розвести нульовий калібратор 2 мл дистильованої води і калібратори 1-5 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C впродовж 1 тижня, для довшого зберігання слід заморозити до -20°C.  
**ПРИМІТКА:** див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
- Ферментний кон'югат (концентрований),** 1 фл. (1,3 мл) моноклональних антитіл до пролактину, кон'югованого пероксидазою хрому (HRPO) в Tris HCl, BSA та стабілізаторах. Консервант: неоміцин. Перед використанням додати 1,2 мл ферментного кон'югату до флакону з розчинником кон'югату (12 мл) або розбавити кон'югат 1:11 розчинником кон'югату (виходячи з необхідного об'єму для проведення аналізу) і ретельно перемішати. Зберігати розведений кон'югат при 2-8°C впродовж 2 місяців.
- Розчинник кон'югату:** 1 фл. (12 мл) Tris-HCl та BSA. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Готовий до використання.
- Контрольна сироватка:** 1 фл. пролактину в основі сироватки. Ліофілізована. Консерванти: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Розвести 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C 1 тиждень; для довшого зберігання заморозити до -20°C.  
**ПРИМІТКА:** див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
- Промивний розчин (концентрований):** 1 фл. (50 мл) PBS і Tween 20. Консервант: тімеросал (<0,05%). Розвести вміст флакону дистильованою водою до 500 мл. У випадку нерозчинених кристалів, обробіть розчин, помістивши флакон на декілька хвилин в інкубатор при 37°C. Зберігати розведений промивний розчин при 2-8°C впродовж 1 місяця.
- Хромоген:** 1 фл. (15 мл) ТМБ із цитрат-фосфатним буфером і DMSO. Рідкий. Готовий до використання.
- Субстратний буфер:** 1 фл. (15 мл) цитрат-фосфатного буферу і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Рідкий. Готовий до використання.  
**ПРИМІТКА:** в скляному посуді провести розведення 1+1 рівних порцій хромогену та субстратного буферу. Уникати прямого попадання світла впродовж 1 год. з часу приготування.
- Блокуючий реагент:** 1 фл. (14 мл) N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Готовий до використання.  
– Адгезивна плівка для планшету  
– Поліетиленовий пакет

#### МАТЕРІАЛИ, ЩО ВИМАГАЮТЬСЯ АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Регульовані, автоматичні мікро піпетки зі змінними насадками.
- Мірна колба.
- Мікропланшетний струшувач на 1200 об/хв..
- Помпа для аспірації або автоматизований пристрій для промивки лунок.
- Мікропланшетний спектрофотометр з абсорбцією в межах 0-3,0 А інтервалу при 450 нм.
- Міліметровий графічний папір.
- Дистильована вода.

#### АВТОМАТИЗОВАНИЙ АНАЛІЗ

- даний аналіз може бути проведений з використанням автоматизованого апарату для ELISA наборів на мікро планшетах.
- Виробник гарантує використання даного набору в автоматизованих апаратах компаній RADIM і/або SEAC.
- При використанні інших автоматизованих мікропланшетних апаратів, відповідальність за правильність аналізів ELISA наборів у них несе користувач.

#### ПОПЕРЕДЖЕННЯ та ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Не змішуйте реагенти різних партій.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- використовуйте ретельно очищений лабораторний посуд, вільний від забруднення іонами металів або окислюючі речовини.
- Використовуйте дистильовану воду, що зберігається в ретельно очищених ємкостях.
- уникайте забруднення зразків. З цією метою для кожної Зразки та реагента використовуйте змінні насадки.
- Виконуйте чітко вимоги щодо інкубації як описано в розділі «Процедура аналізу».

#### Для того щоб уникнути особистого зараження та забруднення середовища, дотримуйтесь наступних застережень:

- Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.

- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте, не пийте, не курить і не користуйтеся косметикою в процесі аналізу.
- Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів. У їх випадку ретельно промийте 3% розчином гіпохлориду натрію. Будь-який очищуючий матеріал такого складу слід вважати потенційно інфекційним та дотримуватись вимог по його утилізації.

#### ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Аналіз може проводитись на зразках сироватки. Високо ліпемічні або гемолізовані Зразки необхідно видалити. Зберігати при 2-8<sup>0</sup>С 1-2 дні. Для довшого зберігання Зразки повинні бути заморожені до -20<sup>0</sup>С. Уникати повторного розморожування/заморожування.

Зразки з концентраціями пролактину більше 150 нг/мл необхідно розвести нульовим калібратором. Рекомендується провести розведення 1:5 (50 мкл сироватки + 200 мкл нульового калібратора).

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ\*

- Доведіть всі реагенти та зразки до кімнатної температури.
  - Перед використанням перемішайте перевертаючи зразки.
1. Приготувати лунки для: бланку, калібраторів, контрольної сироватки і зразків.
  2. Додати у відповідні лунки по **100 мкл** кожного калібратора, контрольної сироватки і зразка.
  3. Додати в кожну лунку по **100 мкл** ферментного кон'югату, крім лунки бланку.
  4. Накрити мікропланшет адгезивною плівкою (постачається в наборі) та легко змішати.
  5. Інкубувати лунки впродовж **60 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.).
  6. Зняти адгезивну плівку і ретельно аспірувати зі всіх лунок інкубаційну суміш.
  7. Промити лунки **4 рази 350 мкл** розведеного промивного розчину. Спірувати всю рідину із лунок.
  8. Розкапати у всі лунки по **200 мкл** розчину хромогену-субстрату (див. розділ Реагенти);
  9. Інкубувати лунки впродовж **15 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.), уникати прямого попадання світла.
  10. Розкапати у всі лунки по **100 мкл** блокуючого реагенту.
  11. Зчитати абсорбцію лунок за допомогою біхроматичного спектрофотометра при **450** з референтною довжиною хвилі **620 нм** (налаштовуючи апарат на нуль лункою бланку). Зчитування необхідно завершити впродовж **1 год** після завершення аналізу.

\*При використанні в процедурі автоматизованих апаратів компаній RADIM і/або SEAC, зсилайтесь на відповідні інструкції.

#### СХЕМА АНАЛІЗУ (Див. ст.. 23)

#### ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використовуючи автоматичні апарати SEAC і/або RADIM для мікропланшетів спектрофотометричне зчитування виконуватиметься автоматично при 3 різних довжинах хвилі: 450, 405 і 620 нм, таким чином розширюючи амплітуду кривої..

Вивести калібрувальну криву на міліметровому графічному папері, виводячи концентрації калібраторів' (вісь абсцис) проти абсорбції, отриманої для кожного калібратора (вісь ординат). Відповідні концентрації пролактину в нг/мл отримуються шляхом інтерполяції абсорбції кожного зразка на калібрувальну криву; у випадку розведених зразків перемножити на фактор розведення.

#### ПРИКЛАД ОБЧИСЛЕННЯ

Нижчезказані значення слід розглядати в якості прикладу та не повинні використовуватися замість даних дослідження.

Опис	Абсорбція	ПРОЛАКТИН
Калібратор 0 нг/мл	0,017	
Калібратор 5 нг/мл	0,033	
Калібратор 10 нг/мл	0,090	
Калібратор 20 нг/мл	0,262	
Калібратор 50 нг/мл	1,051	
Калібратор 150 нг/мл	2,712	
Зразок	0,180	15 нг/мл

#### ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Значення, вказані нижче, є орієнтовними. Рекомендується щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон норми.

Жінки:	2-18 нг/мл (60-540 мкМОмл)
Чоловіки:	2-15 нг/мл (60-450 мкМОмл)

#### Критерії достовірності

Перед початком проведення обчислення результатів переконайтеся, що концентрація контрольної сироватки знаходиться в межах вказаних в листку контролю якості.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

##### Специфічність

Даний метод показав наступні типи перехресної реактивності: 0,1% з ЛГ, ФСГ, ТСГ та ЛГР, 0,01% з ЛХГ та 0,001% з ЛПЛ.

##### Чутливість

Чутливість була визначена на основі калібрувальної кривої і виражена як мінімальна доза, вказуючи на значну різницю із нульовим калібратором (середн. значення + 3 СВ). Ця доза складає **1,5 нг/мл (45 мкМО/мл)**.

##### Точність

Точність була оцінена виходячи із варіативності в межах процедури на між процедурами в 3 сироватках при різних концентраціях пролактину.

#### В межах процедури (повторюваність)

Сироватка	Середн.	+/- (нг/мл)	СВ	КВ %	К-сть реплікатів
A	7,43		0,52	6,99	10
B	26,90		0,55	2,04	10
C	121,75		6,06	4,97	10

**Між процедурами (відтворюваність)**

Сироватка	Середн.	+/- (нг/мл)	СВ	КВ %	К-сть аналізів
A	7,76		0,64	8,24	10
B	29,63		2,23	7,52	10
C	130,55		7,98	6,11	10

**Достовірність**

Достовірність методу була перевірена тестами на відновлення та паралелізм.

**Тест на відновлення**

Відомі послідовні значення пролактину були додані до об'єднання сироваток норми та досліджені.

Додано (нг/мл)	Очікувані (нг/мл)	Отримані (нг/мл)	Відновлення %
P	—	0,55	—
P + 120	120,55	119,80	99,37
P + 60	60,55	63,63	105,0
P + 30	30,55	30,50	99,83
P + 15	15,55	16,05	103,0

**Дослідження на паралелізм**

Сироватка з високим вмістом пролактину була досліджена при різних розведеннях нульовим калібратором.

Розбавлення	Очікувані (нг/мл)	Отримані (нг/мл)
S нерозведений	—	100,90
1:2	50,45	45,47
1:4	25,22	25,05
1:8	12,61	13,44
1:16	6,30	6,33

**«Хук-ефект» високої дози**

Кожного разу, коли зразки з дуже високими концентраціями антигена аналізуються нерозведеними в поетапному "сендвіч"- методі, як в цьому наборі, «хук-ефект» може дати значення концентрацій очевидно нижчі, ніж фактичні значення. В цьому наборі на спостерігається «хук-ефект» в концентрації до 1000 нг/мл (30 000 мкМО/мл).

**ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ**

Результати аналізу повинні ретельно інтерпретуватись і бути підтверджені клінічними оцінками і подальшими діагностичними дослідженнями.

**ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:**

**ПМП «ДІАМЕБ»**  
**вул. Чорновола, 97, м.**  
**Івано-Франківськ, 76005**  
**тел.: (0342) 775122 факс: (0342) 775612**  
**E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)**  
**[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)**