EN ISO 13485

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЛАКТИНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ

Согласована Министерством здравоохранения Республики Беларусь_____

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ предназначен для определения концентрации пролактина в сыворотке или плазме крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 Пролактин представляет собой полипептидную молекулу с молекулярной массой около 23000 Дальтон и состоит из 198 аминокислотных остатков. Молекула гормона содержит также три внутримолекулярные дисульфидные сшивки. Пролактин секретируется передней долей гипофиза. Секреция пролактина опосредованно регулируется гипоталомическим релизингфактором. Пролактин присутствует в сыворотке крови в детектируемых количествах практически у всех людей. Уровень пролактина у женщин, как правило, выше, чем у мужчин. У женщин в процессе индивидуального развития наблюдается некоторое повышение уровня пролактина в период полового созревания, что, вероятно, опосредовано высоким уровнем эстрогенов в крови. Относительное снижение концентрации пролактина наблюдается в период менопаузы. Секреция пролактина происходит периодически и имеет циркадный ритм, причем концентрация пролактина возрастает в процессе сна, достигает максимума в ранние утренние часы и понижается в течение первых нескольких часов бодрствования. При обнаружении незначительного повышения уровня пролактина следует также учитывать, что пролактин является стрессовым гормоном. Рост концентрации пролактина обуславливается как физиологическими, так и психологическими стрессовыми факторами. Физиологическое повышение уровня пролактина наблюдается у женщин в период беременности (в 10-20 раз), в послеродовый период и в период лактации, что связано с важной ролью пролактина в процессе образования и секреции молока.

1.3 Количественное определение пролактина в сыворотке крови используется для диагностики различных эндокринных нарушений: функционального бесплодия, нарушения лактации, синдромах галактореи и аменореи. Данный параметр имеет важное значение для диагностики и выбора тактики лечения пролактиномы и других опухолей гипофиза. Гиперпролактонемия наблюдается и в случае приема медицинских препаратов и веществ психофизического действия.

Директор
Симирский В.В.
КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-моноклональные антитела к пролактину, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 55 мл, общая активность менее 500 кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к пролактину, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы пролактина, в диапазоне концентраций (0-200) нг/мл (точные значения концентраций пролактина указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, 7 флаконов по 0,5 мл. Калибровочные пробы пролактина откалиброваны относительно международного стандартного образца WHO 3rd IS 84/500;
- концентрат промывочного раствора (КПР), 1 флакон, 25 мл;
- контрольная сыворотка (КС) – жидкий препарат, содержащий известное количество пролактина, 0,5 мл, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, 7 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций пролактина – (0,5-200) нг/мл.

2.5 Принцип работы набора заключается в следующем. Иммунорадиометрическое определение пролактина относится к анализам типа "сэндвич". В наборе используется два вида мышиных моноклональных антител к различным эпитопам его молекулы. Исследуемые образцы, контрольные и калибровочные пробы инкубируют в пробирках, покрытых одним видом моноклональных антител, совместно с раствором других моноклональных антител, меченных [^{125}I]. После окончания инкубации удаляют жидкое содержимое, промывают пробирки и измеряют связанную активность [^{125}I]. Концентрацию пролактина, прямо пропорциональную связанной активности, определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-моноклональные антитела к пролактину являются источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [^{125}I] – 60,1 сут.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее - РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения», утверждённых Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 137 от 31.12.2013 г.

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ! Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

3.3 При работе с набором следует надевать спецодежду (халаты) и одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита или другие вирусные инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [2], [3]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [4].

3.5 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,05 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

5.1 Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать колпачками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Директор
Симирский В.В.
КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ! Все реагенты стабильны при (2-8) °С до окончания срока годности набора, указанного на этикетке. Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

5.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз).

Внести в колбу плоскодонную вместимостью 1000 мл с помощью цилиндра мерного 475 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Приготовленный промывочный раствор может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к пролактину маркировать следующим образом (в дубликатах): B_0-B_6 – калибровочные пробы пролактина; $B_{КС}$ – контрольная сыворотка; B_X – исследуемые пробы сыворотки или плазмы крови;

6.2 В пробирки B_0-B_6 внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки B_X внести по 0,05 мл (50 мкл) исследуемых сывороток или плазмы крови.

6.3 Во все пробирки внести по 0,5 мл [^{125}I]-моноклональных антител к пролактину.

6.4 Инкубировать все пробирки в течение 1 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок (не менее 350 встряхиваний в мин).

6.5 После окончания инкубации аккуратно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

6.6 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (см. п.5.3.). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки. После промывки в пробирках не должно оставаться следов окрашенной жидкости.

6.7 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

6.8 Последовательность внесения реагентов в пробирки и проведение других операций анализа приведены в таблице 1. Данную последовательность не нарушать!

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибровочные пробы, контрольная и исследуемые сыворотки, мл	[^{125}I]-моноклональные антитела к пролактину, мл	Инкубировать в течение 1 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании	
B_0-B_6	0,05	0,5		
$B_{КС}$	0,05	0,5		
B_X	0,05	0,5		
Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	После инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса.	Повторить стадию промывки.
B_0-B_6		2,0		
$B_{КС}$		2,0		
B_X		2,0		
Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин				

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок и рассчитать величину B_i/B_{max} в единицах относительной скорости счёта для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки, где B_i – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_6, $B_{КС}$ или B_X.

7.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения B_i/B_{max} или B_i/T в %, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций пролактина в нг/мл в соответствующих калибровочных пробах.

Определить по калибровочной кривой концентрацию пролактина в нг/мл в контрольной и исследуемых сыворотках или плазме крови.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Чувствительность

Минимальная аналитическая концентрация пролактина, определяемая с помощью набора, составляет 0,5 нг/мл.

8.2 Специфичность

Антитела, используемые в данном наборе, имеют высокую специфичность к пролактину. Перекрёстная реакция с близкородственными структурными соединениями составляет:

ХГЧ бета-субъединица – 1,0 %;
ЛГ – 1,0 %;
ФСГ – 1,0 %;
ТТГ – 1,0 %;

КОПИЯ ВЕРНА
Директор
Симирский В.В.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ГР – < 1,0 %;
ПЛ – < 1,0 %.

8.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации пролактина в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием пролактина не превышает 8%.

8.4 Тест на "открытие".

Процент "открытия" пролактина, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией пролактина, составляет (80-110) %.

8.5 Клиническая проверка набора.

При клинических испытаниях набора получены следующие диапазоны концентраций пролактина в сыворотке крови:

Мужчины - 2,7-16 нг/мл;
Женщины - 3,9-27,7 нг/мл;
Женщины в менопаузе - 2,8-12,3 нг/мл.

Приведённые значения являются ориентировочными. В каждой лаборатории рекомендуется установить собственные уровни пролактина, соответствующие нормальным.

8.6 Ограничение метода

В данном наборе используются оптимальные условия проведения анализа, позволяющие минимизировать "хук-эффект высоких доз". Концентрация пролактина 15000 нг/мл открывается больше, чем в максимальной калибровочной пробе. Образцы с высокой концентрацией пролактина, выходящей за пределы калибровочной кривой, можно развести "нулевой" калибровочной пробой и провести анализ повторно. Значения, полученные при разбавлении образцов, следует умножать на фактор разведения.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора должны храниться при температуре (2 – 8) ^{o}C в течение всего срока годности набора. Срок годности набора – 60 суток.

9.2 Определение концентрации пролактина с помощью набора ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ проводят в сыворотке или плазме крови человека. Плазму крови получают с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА.

Образцы сыворотки или плазмы крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Образцы сыворотки или плазмы крови можно хранить при температуре не менее минус 20 °С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

9.3 Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

Директор
Симирский В.В.
КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.4 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

9.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	**Серийный номер** Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	**Использовать до** Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
IVD	**Изделие для диагностики in vitro**
	**Ограничение температуры** Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	**Изготовитель** Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	**Знак радиационной опасности** Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [^{125}I] в наборе, кБк

 УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Тел./факс +375-17-369-82-57 E-mail:hopmang.bel@gmail.com http://www.hopiboh.org

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в БТК, тел. +375-17-268-87-38

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Библиография

[1] Серия норм МАГАТЭ по безопасности, № ST-1.
Правила безопасной перевозки радиоактивных материалов, 1996

[2] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 № 351
О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД.

[3] СП 17-69 РБ 98
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний» утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г. №18

[4] Приказ №165 МЗ РБ от 25.11.2002 г.
О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения

[5] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.07.2019 №74
О проведении обязательных и внеочередных медицинских осмотров работающих.

[6] Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 30.12.2005 № 284
Об утверждении Санитарных правил и норм 2.6.1.13-60-2005 "Гигиенические требования по обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при транспортировании радиоактивных материалов (веществ)".

Инструкция составлена сотрудниками УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»:

Начальник научно-технического отдела, к.б.н. А.И.Щербань

Инженер-технолог 2 категории Н.В.Михайловская

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru