

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
О.С. Лебедин
ноября 2018 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения
пролактина в сыворотке (плазме) крови

«ПРОЛАКТИН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения пролактина в сыворотке (плазме) крови «ПРОЛАКТИН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации пролактина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пролактин представляет собой полипептид из 198 аминокислот с молекулярной массой около 22500 Да, секретируемый эозинофилами передней доли гипофиза. Одной из основных причин бесплодия являются гиперплазия и аденомы гипофиза. Кроме того, функциональные изменения в регуляции репродуктивной функции также связаны с нарушениями в секреции гипофизарных гормонов. Одним из маркеров этих нарушений является нарушенная секреция пролактина. В связи с этим ВОЗ рекомендовано использовать определение уровня пролактина в сыворотке (плазме) крови в качестве скринингового теста при первичном обследовании супругов, обращающихся в медицинские учреждения с проблемой бесплодия. До наступления менархе уровень пролактина в крови низкий и повышается в пубертатный период. В это время пролактин стимулирует развитие молочных желез. В течение менструального цикла уровень пролактина непостоянен. Он повышается в перiovуляторный период и во вторую половину лютеиновой фазы (его уровень может достигать 900 мМЕ/л), поэтому определять уровень пролактина рекомендуется в первую фазу цикла. Во время беременности и лактации секреция гормона возрастает. Кроме того, физиологическая гиперпролактинемия наблюдается при стрессовой ситуации и при физической нагрузке. Секреция пролактина осуществляется в определенном суточном ритме: максимум приходится на период сна (в 3-7 раз выше, чем в течение дня). В связи с этим очень важным является время отбора образцов крови для анализа. Увеличение концентрации пролактина отмечено при пролактинпродуцирующих опухолях гипофиза; идиопатических гиперпролактинемиях (симптомы: у женщин – нарушение менструаций, у мужчин – импотенция); гипофункции щитовидной железы; почечной недостаточности; приеме производных фенотиазина, галоперидола,

имизина, эстрогенов, пероральных контрацептивов, гистаминных препаратов, опиатов; постинсулиновой гипогликемии. Уменьшение концентрации пролактина наблюдается при хирургическом удалении гипофиза, лечении бромокриптином, приеме тироксина, рентгенотерапии.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение пролактина в сыворотке (плазме) крови используется для диагностики бесплодия, нарушения половой функции, мониторинга функции гипофиза и нарушений репродуктивной функции у женщин.

1.4. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

1.5. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

2.2. Принцип работы Набора.

Определение пролактина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к пролактину человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации происходит связывание пролактина, содержащегося в образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к пролактину человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с субстратным раствором тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках.

Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации пролактина в исследуемом образце. Концентрацию пролактина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания пролактина в калибровочных пробах.

2.3. Состав Набора:

- планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию – 1 шт.;
- калибровочные пробы* на основе сыворотки, содержащие известные количества пролактина – C1, C2, C3, C4, C5 мМЕ/мл; концентрации пролактина в калибровочных пробах указана в аналитическом паспорте и на этикетках флаконов, готовы к использованию – 5 флаконов (калибровочная проба C1 мМЕ/л – 2 мл, остальные по 0,8 мл каждая);
- контрольная сыворотка* на основе сыворотки крови человека с известным содержанием пролактина; готова к использованию – 1 флакон (0,8 мл);
- конъюгат; готов к использованию – 1 флакон (14 мл);
- субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию – 1 флакон (14 мл);



- концентрат отмывочного раствора 26х-кратный концентрат – 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент; готов к использованию – 1 флакон (14 мл);
- бумага для заклеивания планшет, готова к использованию – 2 шт;
- инструкция по применению Набора – 1 шт.
- аналитический паспорт (паспорт контроля качества) – 1 шт.

* Метрологическая прослеживаемость осуществлялась, согласно ГОСТ ISO 17511-2011.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая специфичность.

При тестировании образцов содержанием предполагаемых интерферентов с помощью Набора «ПРОЛАКТИН-ИФА» ни одна испытанных из испытанных проб не показала наличие перекрёстной реактивности.

Аналит	Перекрестная реакция
Гормон роста	0,0%
Плацентарный лактоген	0,0%
ТТГ	0,0%
ЛГ	0,0%
ФСГ	0,0%

3.2. Аналитическая чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ПРОЛАКТИН-ИФА» концентрация пролактина в сыворотке (плазме) крови не превышает 5,0 мМЕ/л.

3.3. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания пролактина в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ПРОЛАКТИН-ИФА» не превышает 8,0%.

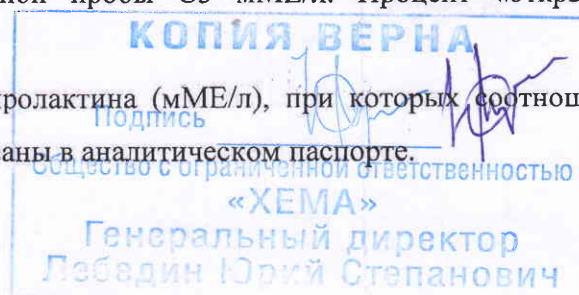
3.4. Линейность.

Зависимость концентрации пролактина в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей пролактин, имеет линейный характер в диапазоне концентраций С2-С5 мМЕ/л и составляет 90-110%.

3.5. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации пролактина предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы С3 мМЕ/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.6. Интерсепт – значения концентраций пролактина (мМЕ/л), при которых соотношение В/В_{С5} соответствует 20%, 50% и 75%. Пределы указаны в аналитическом паспорте.



3.7. Интерференция.

На результаты анализа не оказывало влияния использование антикоагулянтов ЭДТА, гепарин и цитрат натрия, а также присутствие гемоглобина, триглицеридов, холестерина, билирубина, общего белка в концентрациях, не превышающих нормальные клинические значения.

3.8. Референтные значения.

Исследуемая группа	Единицы, мМЕ/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	60	560
Женщины		
Беременные:		
1-й триместр	-	2000
2-й триместр	-	6000
3-й триместр	-	10000
Фазы цикла:		
Фолликулярная	60	600
Лютеиновая	120	900
Менопауза	40	550

В соответствии с правилами GLP (Good Laboratory Practice, Хорошая Лабораторная практика), рекомендуется каждой лаборатории уточнить параметры референтного интервала, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций пролактина в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (5,0 мМЕ/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (С5 мМЕ/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация пролактина ниже 5,0 мМЕ/л или выше С5 мМЕ/л.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1.

4.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении контрольной сыворотки, инактивированы и не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ 1, 2 и антигена р24 ВИЧ-1, антиген вируса гепатита В (HBsAg).

4.3. Набор предназначен только для профессионального использования.

4.4. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными. Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с Набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток), так как образцы сыворотки или плазмы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.

КОПИЯ, ВЕРНА
Подпись: _____
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

4.6. Все отмывочные растворы следует собирать в специальный контейнер и обрабатывать дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке.

4.7. Лабораторную посуду многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.

4.8. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории. При работе с Набором требуется соблюдать «Инструкцию по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утв. Минздравом СССР 17 января 1991 года; ГОСТ Р 52905 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.9. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70% раствором этилового спирта.

4.10. При использовании согласно инструкции по применению изделие является безопасным (не несет физических, экологических и иных рисков). Набор «ПРОЛАКТИН-ИФА» не содержит лекарственных средств для медицинского применения.

4.11. Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

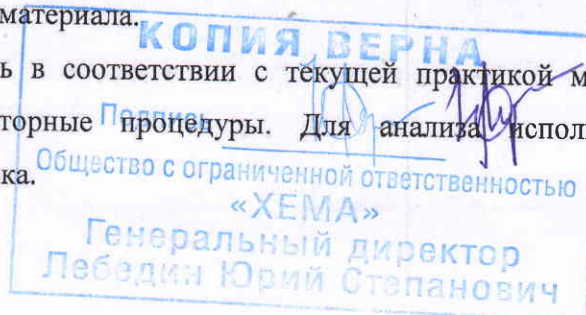
- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

В качестве анализируемого образца используется сыворотка (плазма) крови человека.

6.1. Процедура получения анализируемого материала.

Сбор образцов крови человека проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции, соблюдая стандартные лабораторные процедуры. Для анализа использовать неразведённую сыворотку (плазму) крови человека.



6.2. Подготовка анализируемых образцов.

Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Выбор пробирок для получения сыворотки или плазмы, подготовку, центрифугирование, хранение и транспортировку образца производить согласно правилам проведения преаналитического этапа, утвержденным для лаборатории.

6.2.1. Приготовление анализируемых образцов сывороток крови пациентов.

Кровь отобрать венопункцией, дать полностью свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

6.2.2. Приготовление анализируемых образцов плазмы пациентов. Сбор крови производить в пробирки, содержащие антикоагулянты и немедленно после сбора центрифугировать. В качестве антикоагулянтов использовать ЭДТА, гепарин и цитрат натрия. Рекомендованное соотношение антикоагулянта и биоматериала, а также способы подготовки образца и режимы центрифугирования описаны в инструкции по применению пробирок, используемых лабораторией.

6.3. Если анализ проводился не в день взятия, образцы сыворотки, плазмы крови, следует хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 суток, допускается однократное размораживание/замораживание образцов при температуре -20°C не более 2 месяцев.

Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.5. Образцы с гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом исследованию не подлежат, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.6. Перед проведением анализа исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови, следует выдержать при комнатной температуре $+18-25^{\circ}\text{C}$ не менее 30 мин.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора следует выдержать при комнатной температуре $+18-25^{\circ}\text{C}$ не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов.

Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, во время хранения необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество

КОПИЯ
Подпись
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.

8.2. Если предполагаемая концентрация пролактина в исследуемом образце превышает С5 мМЕ/л, его следует дополнительно развести, используя, калибровочную пробу С1. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения!

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

8.4. Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.

8.5. Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37°C.

8.6. По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

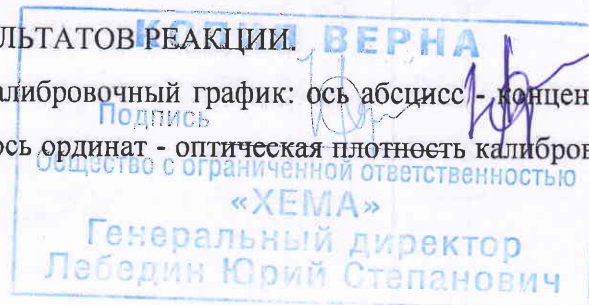
8.7. Внесите во все лунки по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина. Внесение субстратного раствора тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18–25°C) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.

8.8. Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратный раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

8.9. Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс – концентрация пролактина в калибровочных пробах (мМЕ/л), ось ординат – оптическая плотность калибровочных



проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание пролактина в исследуемых образцах. Если используемый образец предразводили (см п. 8.2.), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

10.1. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации пролактина в контрольной сыворотке.

10.2. Набор реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) этого изделия.

11.1. Транспортирование.

11.1.1. Транспортирование Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$. Допускается транспортировка Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 15 суток. Не допускается замораживание целого Набора.

11.1.2. Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения "Холодовой цепи", обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

11.1.3. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.2. Хранение.

Хранение изделий и/или компонентов при температуре от $+2-8^{\circ}\text{C}$ должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение изделий и/или компонентов ниже 0°C должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный

КОПИЯ
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение светочувствительных изделий и/или компонентов должно осуществляться в темном месте.

11.2.1. Набор реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (18 мес.). Не допускается замораживание целого Набора.

11.2.2. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 месяцев.
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 45 суток, допускается хранение при комнатной температуре $+18-25^{\circ}\text{C}$ не более 15 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона.

Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

11.2.3. Допускается однократное замораживание калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах при температуре -20°C в течении всего срока годности Набора.

11.2.4. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11.3. Эксплуатация.

Все комплекты предназначены для ручной постановки и для постановки на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа с возможностью, как дробного использования планшета (набора), так и для постановки целого планшета (набора).

Потенциальный потребитель – врачи клинико-диагностических лабораторий. Профессиональная квалификационная группа "Врачи и провизоры" всех уровней (Приказ № 526 от 06.08.2007 г «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).

Медицинский персонал клинико-диагностических лабораторий должен иметь документированное подтверждение проведенного обучения, связанного с потенциальным риском, сочетающимся с работой, с любым медицинским (клиническим) лабораторным устройством.

11.3.1. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- не использовать Набор после окончания срока годности;

- не использовать Набор реагентов, если упаковка повреждена.
- не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат отмывочного раствора (26х), стоп-реагента, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ));
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.
- использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой.
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
- исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшеты во время проведения исследования.
- не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении иммуноферментного анализа.

11.3.2. Все компоненты Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

11.3.3. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры постановки анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

11.3.4. Изделия и/или компоненты Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» ремонту и техническому обслуживанию не подлежат.

11.4. Утилизация.

11.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

11.4.2. Медицинские отходы класса Б. Утилизацию или уничтожение наборов реагентов требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

11.4.3. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

Предприятие-изготовитель гарантирует стабильность компонентов и Набора, а также соответствие Набора требованиям Технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

