

Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г.Минск, ул.Академика Купревича В.Ф., 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЛАКТИНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ А.С.Романенков
"30" 03 2005 г.

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 гипоталамическим 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 послеродовой 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, синдрома галактореи и аменореи. Данный параметр имеет важное значение для диагностики и выбора тактики лечения пролактиномы и других опухолей гипофиза. Гиперпролактинемия наблюдается и в случае приема медицинских препаратов и веществ психического действия.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-моноклональные антитела к пролактину, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 55 мл;
- 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 стандарта WHO 84/500;

- концентрат промывочного раствора, 1 флакон, 25 мл;
- контрольная сыворотка (КС) – лиофилизированный препарат, содержащий известное количество пролактина, 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. Диапазон определяемых концентраций пролактина – (0,5-200) нг/мл.

2.4 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 [¹²⁵I]. После окончания инкубации удаляют жидкое содержимое, промывают пробирки и измеряют связанную активность [¹²⁵I]. Концентрацию пролактина, прямо пропорциональную связанной активности, определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) (Нормы радиационной безопасности НРБ-2000 и основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности ОСП-2002).

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 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, предусмотренных приказами МЗ РБ № 66 и № 351.

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

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;

- водоструйный насос типа КМ-1230;

- 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;

- стакан химический или колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые хирургические.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

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

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

5.3 Во флакон с КС внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 30 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

КС можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 24 ч. При необходимости более длительного хранения, КС следует разделить на несколько аликвов и заморозить при температуре не менее минус 20 °С. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к пролактину маркировать следующим образом (в дубликатах): В₀-В₆ – калибровочные пробы пролактина; В_{КС} – контроль

ная сыворотка; V_x – исследуемые пробы сыворотки или плазмы крови;

6.2 В пробирки V_0 - V_6 внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $V_{КС}$ внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки V_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 комнатной 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.5.2). 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!

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций		
	Калибровочные пробы, контрольная и исследуемые сыворотки, мл	^{125}I -моноклональные антитела к пролактину, мл	Содержимое пробирок тщательно перемешать. Инкубировать в течение 1 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании
V_0 - V_6	0,05	0,500	
$V_{КС}$	0,05	0,500	
V_x	0,05	0,500	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.	Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин
V_0 - V_6		2		
$V_{КС}$		2		
V_x		2		

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок и рассчитать величину V_i/V_0 для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки,

где V_i – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках V_1 - V_6 , $V_{КС}$ или V_x .

7.2 Построить калибровочную кривую в полупологарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения V_i/V_0 в единицах относительной скорости счета, 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 концентрация пролактина, определяемая с помощью набора, составляет 0,5 нг/мл.

8.2 Воспроизводимость результатов

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

8.3 Тест на "открытие"

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

8.4 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.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

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.

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 строго соблюдать инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций пролактина, соответствующие нормальным.