

НАБОР ЧПРЛ [I] IRMA

(Номер по каталогу: RK-780CT)

Система ¹²⁵I-ЧПРЛ IRMA позволяет проводить прямое количественное определение человеческого пролактина (ЧПРЛ) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение ЧПРЛ может проводиться в диапазоне 0-170 нг/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 100 мкл.

Введение

Человеческий пролактин (ЧПРЛ) представляет собой гормон белка с молекулярной массой 22 000 дальтон. Пролактин вырабатывается передней долей гипофиза, и его секреция находится под контролем гипоталамуса. Высвобождение пролактина регулируется пролактин-ингибирующим фактором (ПИФ) и было показано, что TRG стимулирует высвобождение пролактина. Основным физиологическим действием пролактина является иницирование и поддержание лактации. Гиперпролактинемия является частой причиной бесплодия и гонадной дисфункции у женщин и мужчин. Измерение пролактина также представляет интерес в оценке и в содержании пациента с аменореей и галактореей. Существуют разнообразные физиологические и патологические состояния, влияющие на уровень Пролактина: высокие концентрации наблюдаются во время беременности, лактации и стресса. Уровень Пролактина повышается некоторыми психотропными веществами и антигипертензивными препаратами и уменьшается введением L-допа и бромкриптина.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммунорадиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоафинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченое ¹²⁵I, связывается с эпитопом молекулы ПРЛ, которая отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело – антиген – сигнальное антитело, также известного как «сэндвич».

В течение 1-го часового инкубационного периода при непрерывном помешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционную смесь извлекают, пробирки тщательно промывают и производят замер их радиоактивности в гамма-счетчике. Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности,

измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество ЧПРЛ, может быть определена искомая концентрация ЧПРЛ в образцах пациента.

Содержание набора

- 1 флакон (21 мл) МЕТКИ, готовой к использованию, содержащей около 740 кБк ¹²⁵I-анти-ЧПРЛ и иммобилизованные анти-ЧПРЛ в буфере с красным красителем 0.1 % NaN₃.
- 6 флаконов лиофилизированных СТАНДАРТОВ (1 мл), в бычьей сыворотке с 0.1% NaN₃. Концентрации стандартов указаны в этикетках и в прилагаемом сертификате качества. См. *Приготовление реактивов*.
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (1 мл). Лиофилизированная сыворотка крови человека с 0.1% NaN₃. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества. См. *Приготовление реактивов*.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованные в пластиковые коробочки.
- 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), с 0.2% NaN₃. См. *Приготовление реактивов*. Сертификат качества Листок-вкладыш инструкция пользования

Материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (100, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревая мешалка, шейкер, полимерная пленка, абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

автоматические пипетки (напр. Eppendorf или др.), диспенсер с резервуаром 1 л (вместо 2 мл пипетки)

Коллекция образцов и хранение

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °C, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (- 20 °C). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторной заморозки и разморозки. Не используйте липемические, гемолизированные или мутные образцы. Образцы сыворотки с концентрацией ЧПРЛ выше, чем в самом концентрированном стандарте, следует разбавить и проанализировать еще раз.

Приготовление реактивов, хранение

Для получения 720 мл промывочного раствора добавьте 20 мл концентрата промывочного буфера к 700 мл дистиллированной воды. После разбавления промывочный буфер можно хранить при температуре 2-8°C до окончания срока годности. Добавьте 1000 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным стандартам и контрольной сыворотке. Аккуратно перемешайте встряхиванием или взбалтыванием (следует избегать образования пены). Убедитесь, что достигнуто полное растворение и дайте раствору уравниваться при комнатной температуре в течение 20 минут. После восстановления стандартов и контроля хранения может быть при температуре ниже -20 °C до окончания срока годности. Открытые образцы следует хранить при температуре 2-8 °C. При данной температуре все реактивы стабильны до истечения срока годности. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Уравновесьте все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Тщательно смешайте все реактивы и образцы перед использованием. Избегайте чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Промаркируйте два экземпляра пробирок с покрытием для каждого из стандартов (S1-S6), контрольной сыворотки и образцов. Опционально, промаркируйте две пробирки для общего счета (T)
2. Внесите пипеткой по 100 мкл стандартов, контрольной сыворотки и образцов в правильно промаркированные пробирки. Для фиксации пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь или не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
3. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 200 мкл метки.
4. Закройте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и настройте скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
5. Инкубируйте пробирки в течение 1 часа в комнатной температуре при постоянном помешивании.
6. Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.

7. Верните штатив с пробирками в прежнее положение и повторите шаг 6 еще один раз.
8. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
9. Рассчитайте концентрацию ПРЛ в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов» или используйте для этого специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Всего	Стандарт	Конт-роль	Образец
Стандарт		100		
Конт-роль			100	
Образец				100
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить переверну-тую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Измерьте уровень радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2. Рассчитайте среднее значение в минуту (СРМ) для каждой пары исследуемых пробирок. Рассчитать нормализованное процентное связывание для каждого стандарта (S), контрольной сыворотки (C) и образца (M) соответственно, используя следующую формулу:

$$В/Т(\%) = \frac{S_{2.6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_1(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график В/Т (%) для каждого стандарта в соответствии с соответствующей концентрацией ПРЛ. Определите концентрацию ПРЛ в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных прикладных программ автоматической обработки данных, в данном случае можно использовать логит-преобразование или аппроксимацию данных с помощью слайд-функций.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	чПРЛ (нг /мл)	Среднее значение срм	В/Т %
T		278224	
S1	0	59	0.02
S2	2	2277	0.82
S3	7	7169	2.58
S4	18	19278	6.96
S5	52	54597	19.7
S6	160	137653	49.7
C	7.3	7515	2.7

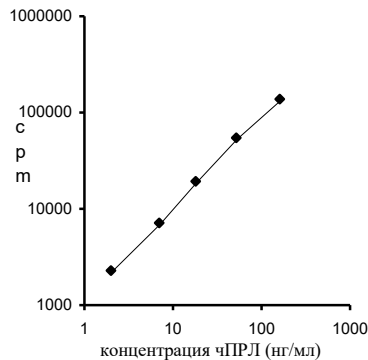


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для подсчета значений неизвестных образцов)

Характеристика количественного определения

Калибровка

1 нг подготовки калибратора эквивалентно 35 мкМЕ NIBSC 97/714 эталонного реагента

Чувствительность

Значение предела обнаружения, которое составило 0.04 нг/мл, было получено в результате тестирования 20 копий нулевого стандарта. Чувствительность была определена как концентрация, соответствующая сумме среднего значения срм и его двух стандартных отклонений.

Специфичность

Моноклональные антитела, использованные в данном наборе IRMA, являются специфичными к чПРЛ. При нормальных физиологических концентрациях не было выявлено перекрестной реактивности с чПЛ и чГГ.

Точность

Для определения внутрисубъектной вариабельности были проанализированы 3 образца пролактина в сыворотке в 20 повторах. Полученные значения приведены ниже.

Образец	Среднее значение нг/мл	CO	CV %
1	6.36	0.31	4.82
2	12.21	0.57	4.67
3	27.69	0.79	2.86

Воспроизводимость

Для определения межсубъектной вариабельности 3 образца сыворотки

измерялись дважды в ходе 18 независимых анализов. Ниже представлены полученные значения.

Образец	Среднее значение нг/мл	CO	CV %
1	6.89	0.53	7.74
2	15.77	1.54	9.74
3	31.57	2.33	7.37

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в 5 образцах сыворотки с известным количеством чПРЛ на 3 уровнях. Средний процент восстановления составил 97-107% (среднее значение: 102,6%).

Тест разведения (линейность)

Исследование 5 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Восстановления после разведения составило 98-108%. Ниже приведена формула для расчета измеренной концентрации (X) в зависимости от ожидаемой концентрации (Y), которая демонстрирует хорошую линейность:

$$Y = 1.0242X - 0.0724 \quad R^2 = 0.9989 \quad n = 20$$

Ожидаемые значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные интервалы эталонных значений.

	Мужчины	Женщины	Менопауза
Образцы	113	147	94
Среднее	5.47	8.40	5.91
Медиана	4.52	7.25	5.06
95% диапазон	2-14	3-20	2-15

Ограничения метода

- Реагенты, поставляемые с данным набором предназначены для изменения уровня чПРЛ в сыворотке.

- Следует избегать повторной заморозки и разморозки реагентов, поставляемых с данным набором и образцов.

- Не рекомендуется использовать гемолизированные и липемические образцы из за риска получения ложных результатов.

- При концентрациях чПРЛ до 2500 нг/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует. Образцы с концентрацией, превышающей максимальную концентрацию стандарта, необходимо разбавить стандартом S1 (0 мМЕ/мл) и повторно провести количественное определение.

- Результаты количественного определения должны интерпретироваться с учётом клинических данных пациента.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Пробирки для проведения реакции упакованы в пластиковые коробки и не промаркированы индивидуально. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перепутать их с обычными пробирками. Для минимизации риска ошибки не берите из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо. Оставшиеся после работы неиспользованные пробирки положите обратно в коробку. Пробирки, используемые для количественного определения, рекомендуется пометить маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки следует плотно установить на штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

3) **Добавление промывочного буфера.** Для добавления промывочного буфера рекомендуется использовать стандартный лабораторный диспенсер со стеклянной флаконом объемом 1л и наконечником с гибкой соединительной трубкой. Если такого прибора нет в наличии, то можно использовать шприц большого объема, присоединенную к автоматической пипетке.

Дополнительная информация:

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуоферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (анти-HCV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg).

Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови

человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Вещества, полученные от крупного рогатого скота, были получены в странах, где не зарегистрированы случаи развития губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. Тем не менее вещества животного происхождения должны расцениваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 68 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.



Срок годности **CONTROL** Контроль



Номер партии **CAL** Стандарт



Внимание, обратитесь к сопроводительным документам **CT** Пробирка с покрытием




Биологическая опасность **TRAC** Метка



См. руководство по использованию **WASHB** Промывочный буфер



Устройство для проведения диагностики in vitro  Температурный предел **2-8°C** Хранить при температуре 2-8°C



Производитель  Радиоактивный материал

REF

Номер по каталогу



Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES CO. LTD.

H-1121 Budapest, Konkoly-Thege Miklós út 29-33

Тел.: (36-1)392-2577,

Факс: (36-1)395-9247

Обновлено: март 2021