EN ISO 13485

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИРМА-ЛГ-СТ

Согласована Министерством здравоохранения Республики Беларусь_____

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-ЛГ-СТ предназначен для определения концентрации лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке или плазме крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 Лютеинизирующий гормон (ЛГ) является гликопротеином с молекулярной массой 28 кДа, который секретируется передней долей гипофиза. Он состоит из двух нековалентно связанных субъединиц - альфа и бета. Альфа-субъединица ЛГ является общей и для других гликопротеидных гормонов гипофиза: тиреотропного гормона (ТТГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Бета-субъединица определяет биологическую и иммунологическую специфичность гормона, что позволяет отличить ЛГ от других гликопротеидных гормонов. У женщин ЛГ совместно с ФСГ стимулирует овуляцию и образование желтого тела. В отсутствие оплодотворения продуцируемые желтым телом прогестерон и эстрадиол блокируют секрецию ЛГ и ФСГ. При беременности функции ЛГ по стимуляции продукции стероидных гормонов желтым телом принимает на себя хорионический гонадотропин (ХГ). У мужчин ЛГ совместно с ФСГ и тестостероном стимулирует сперматогенез. Во время пубертатного периода под воздействием ФСГ клетки Лейдига приобретают способность отвечать на ЛГ продукцией тестостерона. У женщин до наступления менопаузы определение ЛГ имеет диагностическое значение при нерегулярных менструациях, ановуляторном бесплодии или дисфункциональных маточных кровотечениях. Постоянно высокая концентрация ЛГ в отсутствии пульсаций наблюдается при поликистозе яичников. У женщин после наступления менопаузы определение ЛГ целесообразно при гипофизэктомии. В пубертатный период высокая концентрация ЛГ может свидетельствовать о тестикулярной недостаточности, а низкая - о нарушениях гипоталамо-гипофизарной функции. Определение ЛГ позволяет также выявить случаи крипторхизма, связанные с первичной тестикулярной недостаточностью.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-моноклональные антитела к ЛГ, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон; 5,5 мл, общая активность менее 500 кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ЛГ, готовы к использованию, 100 шт.;

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

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

- калибровочные пробы ЛГ, в диапазоне концентраций (0; 1,0-200) МЕ/л (точные значения концентраций ЛГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, 7 флаконов по 1 мл. Калибровочные пробы ЛГ откалиброваны относительно международного стандартного образца 2 IS 80/552;

- концентрат промывочного раствора (КПР), 1 флакон, 25 мл;

- контрольная сыворотка (КС) - жидкий препарат, содержащий известное количество ЛГ, 1 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 3 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций ЛГ – (0,5-200) МЕ/л.

2.5 Принцип работы набора заключается в следующем. Иммунорадиометрическое определение ЛГ 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 ЛГ, прямо пропорциональную связанной активности, определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-моноклональные антитела к ЛГ 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.

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 любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

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

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 0,1 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические резиновые.

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.

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

КОПИЯ ВЕРНА
Директор
Симирский В.В.

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

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

6.2 В пробирки B_0-B_6 внести по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,1 мл (100 мкл) КС. В пробирки Вх внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых сывороток или плазмы крови.

6.3 Во все пробирки внести по 0,05 мл (50мкл) [^{125}I]-моноклональных антител к ЛГ.

6.4 Инкубировать все пробирки в течение 1,5 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 тщательно 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.

Таблица 1

<table>
<tr><td rowspan="2">Пробирки (в дубликатах)</td><td colspan="4">Последовательность операций</td></tr>
<tr><td>Калибровочные пробы, контрольная и исследуемые сыворотки, мл</td><td>[^{125}I]-моноклональные антитела к ЛГ, мл</td><td colspan="2">Инкубировать в течение 1,5 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании</td></tr>
<tr><td>B_0-B_6</td><td>0,1</td><td>0,05</td><td colspan="2" rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>$B_{КС}$</td><td>0,1</td><td>0,05</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>0,1</td><td>0,05</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Пробирки (в дубликатах)</td><td colspan="4">Последовательность операций</td></tr>
<tr><td rowspan="4">После инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса</td><td>Промывочный раствор, мл</td><td rowspan="4">Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса</td><td rowspan="4">Повторить стадию промывки</td></tr>
<tr><td>B_0-B_6</td><td>2</td></tr>
<tr><td>$B_{КС}$</td><td>2</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>2</td></tr>
<tr><td colspan="5">Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин</td></tr>
</table>

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

Директор
Симирский В.В.
КОПИЯ ВЕРНА
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

относительной скорости счета, 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 ЛГ, в МЕ/л, в соответствующих калибровочных пробах.

Определить по калибровочной кривой концентрацию ЛГ в контрольной и исследуемых сыворотках или плазме крови.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Чувствительность

Минимальная концентрация ЛГ, определяемая с помощью набора, составляет 0,5 МЕ/л.

8.2 Специфичность

Антитела, используемые в данном наборе, обладают высокой специфичностью к ЛГ. Перекрёстная реакция с близкородственными структурными соединениями составляет:

ХГЧ бета-субъединица	– < 0,5 %;
ХГЧ	– 0,0 %;
ФСГ	– < 0,1 %;
ТТГ	– < 0,1 %.

8.3 Воспроизводимость результатов

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

8.4 Тест на "открытие"

Процент "открытия" ЛГ, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ЛГ, составляет (80-120) %.

8.5 Клиническая проверка набора

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

Мужчины		1- 9	МЕ/л
Женщины:	фолликулярная фаза	1-10	МЕ/л
	предовуляторный пик	5-30	МЕ/л
	лютеиновая фаза	1-10	МЕ/л
	менопауза	> 12	МЕ/л
Препубертатные дети		< 1	МЕ/л

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

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора должны храниться при температуре (2 – 8) °С в течение всего срока годности набора. Срок годности набора – 60 суток.

Директор
Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

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

9.2 Определение концентрации ЛГ с помощью набора ИРМА-ЛГ-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 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

Директор
Симирский В.В

КОПИЯ ВЕРНА

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

	**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

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 осмотро 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

КОПИЯ ВЕРНА Директор Симирский В.В.

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