

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2010 г.

№ _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

«11» января 2010 г

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения
фолликулостимулирующего гормона в сыворотке (плазме) крови

«ФСГ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

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

1.2. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) - гликопротеид с молекулярной массой около 30000 Да. Он секретируется базофильными клетками аденогипофиза. У женщин ФСГ контролирует циклические изменения в яичниках во время нормального менструального цикла. У мужчин ФСГ контролирует рост и функцию семенных канальцев, особенно сперматогенез в клетках Сертоли.

В начале нормального менструального цикла уровень ФСГ выше, чем в заключительной стадии фолликулярной фазы. Пик концентрации ФСГ наблюдается в середине цикла, одновременно с пиком ЛГ. В лютеиновой фазе концентрация гормона падает в ответ на продукцию эстрадиола и прогестерона желтым телом. Снижение концентрации эстрогенов и прогестерона в конце менструального цикла приводит к повышению уровня ФСГ (по принципу обратной связи), и начинается новый цикл.

Повышенные концентрации ФСГ определяются при дисгенезии семенных канальцев, задержке полового созревания, первичной недостаточности функции яичек, недостаточности клеток Сертоли у мужчин; менопаузе, преждевременном угасании функции яичников, агенезии яичников у женщин; дисфункции гипофиза; приеме кломифена, леводопа. Сниженные концентрации ФСГ определяются при гипопитуитаризме; приеме пероральных контрацептивов, фенотиазин, эстрогенов.

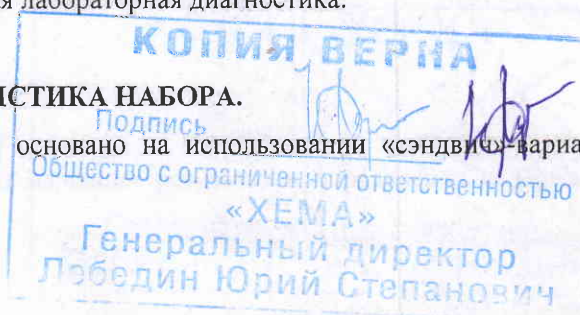
1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение ФСГ в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики патологий щитовидной железы различной этиологии.

1.4. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение основано на использовании «сэндвич»-варианта



твёрдофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к β -цепи ФСГ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации происходит связывание ФСГ, содержащегося в образце, с антителами на твёрдой фазе. Количество связавшегося ФСГ пропорционально его концентрации в исследуемой пробе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител к α -цепи ЛГ/ФСГ/ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках.

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

2.2. Состав Набора:

- планшет 96-луночный стрипированный; готов к использованию - 1 шт;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ФСГ - 0; 5; 25; 50 и 100 МЕ/л ФСГ; концентрации ФСГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (калибровочная проба 0 МЕ/л – 2,0 мл, остальные – по 0,8 мл каждая);
- конъюгат, готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ФСГ, готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- концентрат отмывочного раствора 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент, готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- липкая лента на бумажной подложке для заклеивания планшета, готова к использованию - 2 шт.
- аналитический паспорт;
- Инструкция по применению Набора.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к β -цепи ФСГ с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
ТТГ	<0,1
ЛГ	<0,1
ХГ	<0,1

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания



ФСГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ФСГ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ФСГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ФСГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-100 МЕ/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ФСГ - соответствие измеренной концентрации ФСГ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 МЕ/л. Процент «открытия» составляет 90 -110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором концентрация ФСГ не превышает 0,3 МЕ/л.

3.6. Клиническая проверка.

Клиническая проверка	Нижний предел, МЕ/л	Верхний предел, МЕ/л
Дети до 11 лет	0,0	4,0
Мужчины	0,8	13
Женщины		
Фазы цикла:		
фолликулярная	3,0	12
овуляция	6,0	25
лютеиновая	2,0	12
менопауза	10,0	150

В соответствии с требованиями **GLP** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинко-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «ФСГ-ИФА» уточнить значения концентрации ФСГ, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

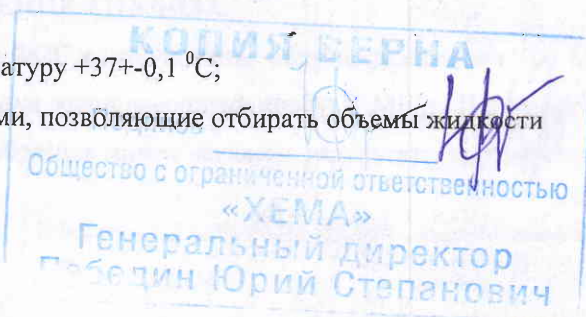
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;



- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение времени не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре минус 20°C не более 2 недель. Не допускается повторное замораживание-оттаивание анализируемых образцов. При несоблюдении этих условий возможно резкое снижение уровня ФСГ в исследуемых образцах.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

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

6.5. 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 ФСГ в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация ФСГ в исследуемом образце превышает 100 МЕ/л, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0 МЕ/л. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения.

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

7.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

7.3 Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета произвести в течение 5-10 мин.

7.4. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$.

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки 5 раз. При каждой промывке добавить во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора, перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.7. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение времени не более 15 мин после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация ФСГ в калибровочных пробах (МЕ/л), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП_{450}). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание ФСГ в анализируемых пробах. Если используемый образец предразводили, умножить полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Подпись _____
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Победин Юрий Степанович

10.1. Набор реагентов «ФСГ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

Допускается однократное замораживание (-20°C) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

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

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

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;
- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20°C в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 5 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

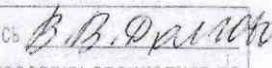
По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «ФСГ-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА»  К. Б. Н. Д. С. Кострикин
11 января 2010 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава

д.м.н., профессор В. В. Долгов

Подпись 
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись 

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