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 лютеинизирующего гормона в сыворотке (плазме) крови

«ЛГ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

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

1.2. Лютеинизирующий гормон (ЛГ) - гликопротеид с молекулярной массой около 28000 Да. Он секретируется гонадотропными клетками передней доли гипофиза. У женщин ЛГ регулирует функцию желтого тела и стимулирует биосинтез прогестерона. У мужчин ЛГ стимулирует образование тестостерона в интерстициальных клетках Лейдига.

Уровень гормона в течение менструального цикла остается низким, за исключением середины цикла, когда его концентрация может возрастать в 5-10 раз. Примерно за 12 часов до возникновения пика ЛГ ему предшествует пик эстрадиола, а сама овуляция происходит спустя 12-20 часов после достижения максимальной концентрации ЛГ. У женщин гормон стимулирует разрыв яичника и образование желтого тела, которое начинает секретировать в кровь прогестерон, увеличивая таким образом его концентрацию в лютеиновую фазу.

Содержание ЛГ в крови как у мужчин, так и у женщин зависит от суточного ритма, поэтому определение этого гормона следует проводить в одно и то же время. Периодические увеличения концентрации ЛГ более выражены у женщин (в зависимости от стадии менструального цикла). Так, колебания уровня гормона становятся менее частыми в конце лютеиновой стадии, а их выраженность - в конце фолликулиновой.

Увеличение концентрации ЛГ наблюдается при первичной дисфункции половых желез; аменорее, вызванной недостаточностью яичников; синдроме Штейна-Левенталя; менопаузе.

Снижение концентрации ЛГ наблюдается при нарушении фукции гипофиза или гипоталамуса; синдроме галактореи-аменорреи; изолированном дефиците гонадотропных гормонов; изолированном дефиците ЛГ («фертильный евнух»); невротической анорексии; задержке роста и полового созревания; приеме дигоксина, мегестрола, фенотиазина, прогестерона, эстрогенов.

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

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

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение ЛГ 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 твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к β-цепи ЛГ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации происходит связывание ЛГ, содержащегося в образце, с антителами на твердой фазе. Количество связавшегося ЛГ 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 ЛГ в исследуемом образце. Концентрацию ЛГ в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания ЛГ в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с иммобилизированными на внутренней стороне мышиными моноклоналльными антителами к β-цепи ЛГ человека; готов к использованию - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ЛГ - **0; 5; 25; 50 и 100 МЕ/л** ЛГ; концентрации ЛГ 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 ЛГ, готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент** (5,0 % серная кислота), 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 мышиных моноклональных антител к β-цепи ЛГ

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

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

с другими аналитами приведена в таблице:

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

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

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

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ЛГ - соответствие измеренной концентрации ЛГ 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 ЛГ не превышает 0,3 МЕ/л.

3.6. Клиническая проверка.

Клиническая проверка	Нижний предел, МЕ/л	Верхний предел, МЕ/л
Дети до 11 лет	1,0	5,0
Мужчины	1,5	9,0
Женщины		
Фазы цикла:		
фолликулярная	2,0	9,5
овуляция	10,0	45
лютеиновая	0,5	17
менопауза	5,0	57

В соответствии с требованиями ***GLP*** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практиа) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «ЛГ -ИФА» уточнить значения концентрации ЛГ, 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

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

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

раствора в лунках при длине волны 450 нм;

- **термостат**, поддерживающий температуру +37±0,1 ^{0}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 ^{0}C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C не более 24 ч или при температуре минус 20 ^{0}C не более 2 недель. Не допускается повторное замораживание-оттаивание исследуемых образцов. При несоблюдении этих условий возможно резкое снижение уровня ЛГ 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 мышиные 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 ЛГ 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 ^{0}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 ^{0}C) не более 2 сут. или при температуре +2-8 ^{0}C не более 10 сут.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

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

7.2. Внести во все лунки по 100 мкл коньюгата.

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 исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов лунки планшета необходимо производить не более 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 ^{0}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 ^{0}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 ЛГ 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 ЛГ в исследуемых пробах. Если

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

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

используемый образец предразводили, умножить полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «ЛГ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 ^{0}C не более 5 сут.

Допускается однократное замораживание (минус 20 ^{0}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 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) не более 5 сут. или при температуре +2-8 ^{0}C не более 30 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}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 «ЛГ-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. М.П.

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов
М.П.

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

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