

**УТВЕРЖДАЮ**

**Заместитель генерального директора  
ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»**

**О.Н. Шлюндин**

**2012 г.**



**И Н С Т Р У К Ц И Я**  
**по применению набора реагентов**  
**«ДС-ИФА-Гонадотропин-ЛГ»**  
**Тест-система иммуноферментная для количественного определения**  
**лютеинизирующего гормона**

**1. Назначение**

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

1.2. ЛГ – гликопротеиновый гормон с молекулярной массой около 28000 Да, синтезируемый передней долей гипофиза. ЛГ состоит из двух субъединиц – альфа (сходной у всех гормонов передней доли гипофиза) и бета, определяющей биологическую активность гормона. У женщин ЛГ участвует в регуляции менструального цикла, у мужчин стимулирует синтез тестостерона в клетках Лейдига семенников.

Уровень гормона в течение менструального цикла остается низким, кроме середины цикла. Примерно за 12 ч до возникновения пика ЛГ наблюдается пик эстрадиола, а сама овуляция происходит через 12-20 часов после достижения максимального уровня ЛГ.

Количественное определение уровня ЛГ в крови имеет диагностическое значение при наличии патологий в половой сфере пациента, выявлении причин бесплодия, при определении менопаузы, точного времени овуляции и наблюдении за ходом эндокринной терапии.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех стандартных калибровочных проб.

**2. Характеристика набора**

**2.1. Принцип действия.**

В наборе «ДС-ИФА-Гонадотропин-ЛГ» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум донам молекулы ЛГ: первые антитела иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ЛГ-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ЛГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ЛГ в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ - Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ЛГ в анализируемом образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ЛГ в исследуемых пробах.

## 2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Гонадотропин-ЛГ»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ЛГ.	1 шт.
Конъюгат - моноклональные антитела к ЛГ, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму Международному стандарту ВОЗ IRP 80/552 (принятому взамен 1 IRP 68/40), содержащие известные количества ЛГ. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций ЛГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	6 флаконов по 0,5 мл (Калибратор 0 – 2,0 мл)
Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием ЛГ. Прозрачная или опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации ЛГ в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;
- пластиковые ванночки для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

## 3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ЛГ в сыворотке крови человека составляет 0,3 мМЕ/мл.

3.2. Специфичность. Для определения кросс-реактивности в образец сыворотки с известной концентрацией ЛГ добавляли кросс-реагенты, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
ЛГ	100
ФСГ	0,27
ХГЧ	0,04
ТТГ	0

3.3. Коэффициент вариации результатов определения ЛГ в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации ЛГ в образцах сыворотки крови при разведении их «Калибратором 0» имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Определяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации ЛГ в пробе, полученной смешением равных объемов контрольной сыворотки и «Калибратора 2». Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию ЛГ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 80 здоровых мужчин и у 200 здоровых женщин в возрасте от 21 до 60 лет в различных фазах менструального цикла.

Группа		Разброс концентраций, мМЕ/мл
Женщины	фолликулярная фаза	0,9 – 15,0
	овуляционный пик	15,0 – 90,0
	лютеиновая фаза	0,8 – 15,0
	постменопауза	10,0 – 65,0
Мужчины		1,2 – 9,0

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ЛГ, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

#### 4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.

4.2. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:

- неспецифических компонентов (ПР (концентрат х 25), ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».

4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.

4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгата.

4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.

4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

4.9. Промывка лунок - важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.

4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.

4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

## 5. Инструкция по безопасности

5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.

5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении Калибраторов и Контрольной сыворотки, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.

5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

5.4. Нельзя пипетировать ртом.

5.5. При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.


5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезинфекции – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твердые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



5.11.  xi Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

## **6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:**

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат для инкубации при температуре  $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ ;
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ ;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. Анализируемые образцы сывороток крови человека**

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов с добавлением азида натрия в качестве консерванта! Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

## **8. Подготовка реагентов для анализа**

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

**8.1. Иммуносорбент. Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут.**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

**8.2. ПР - рабочий промывочный раствор.** Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

**8.3. Конъюгат - готов к применению.**

**8.4. Стандартные калибровочные пробы - готовы к применению.**

**8.5. Контрольная сыворотка - готова к применению.**

**8.6. ТМБ–Субстратный раствор - готов к применению.**

**8.7. Стоп-реагент - готов к применению.**

## 9. Проведение анализа

9.1. Перед проведением ИФА необходимо вставить в рамку нужное количество стрипов.

9.2. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести дозатором по 25 мкл исследуемых сывороток в двух повторах.

**Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 мин!**

9.3. Во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, стрипы планшета закрыть крышкой или защитной пленкой.

9.4. Возможны три процедуры инкубации планшета:

**Процедура 1 (термостат,  $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ ):**

Планшет инкубировать 60 минут во влажной камере в термостате при температуре  $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ .

Для создания влажной камеры планшет закрыть крышкой, на которую положить смоченную водой фильтровальную бумагу, планшет поместить в полиэтиленовый пакет, после чего края пакета завернуть вниз.

**Процедура 2 (термостатируемый шейкер,  $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ ):**

Планшет инкубировать 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре  $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

**Процедура 3 (комнатная температура):**

После внесения в лунки планшета образцов и конъюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре (здесь  $20-25^\circ\text{C}$ ).

9.5. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

9.6. Во все лунки планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

**Процедура 1:** 20-30 мин.

**Процедура 2:** 20-30 мин.

**Процедура 3:** 15-20 мин.

9.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки стрипов по 150 мкл стоп-реагента, встряхивать стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

9.8. **Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-Гонадотропин-ЛГ» на автоматических ИФА-анализаторах.** Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,500.

## 10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

## 11. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора - не более 0,1.

На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации ЛГ (мМЕ/мл), по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций ЛГ в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ЛГ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

## 12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для определения лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения лютеинизирующего гормона (ЛГ) в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

12.2. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры теста могут повлиять на результаты.

12.3. Для разведения образцов сывороток с высоким содержанием ЛГ следует использовать «Калибратор 0». Применение других реагентов может привести к ложным результатам.

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

12.5. ЛГ подавляется эстрогеном, у женщин, принимающих оральные контрацептивы, уровень лютеинизирующего гормона может быть низким или нормальным. Чрезмерная диета и потеря веса могут привести к снижению концентрации гонадотропина.

12.6. Наличие гетерофильных антител у пациентов, имеющих дело с животными или получавших моноклональные антитела в качестве лечения, может оказывать влияние на результаты иммунологических тестов.

12.7. Хук-эффект в данном тесте не наблюдался.

12.8. Набор не предназначен для тестирования образцов сывороток крови новорожденных.

## 13. Условия хранения и эксплуатации набора

13.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 18 месяцев.

13.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

13.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат x 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат x 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стандартные калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ–Субстратный раствор - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ–Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

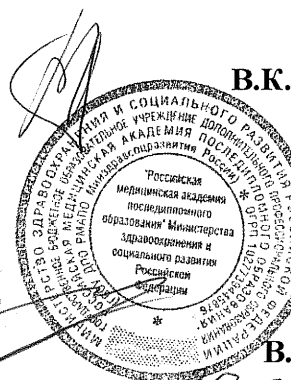
#### 14. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству  
ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»

СОГЛАСОВАНО  
Зав.кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГБОУ ДПО РМАПО  
Минздравсоцразвития России  
д.м.н, профессор

В.К. Пименов



Подпись *Пименов В.К.*  
удостоверяю:  
Специалист по кадрам РМАПО  
Подпись \_\_\_\_\_  
30.07.2012

В.В. Долгов