

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля качества,  
эффективности, безопасности лекарственных  
средств и медицинской техники МЗ РФ  
\_\_\_\_\_ Р.У. Хабриев  
«08» ноября 2000 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА**  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
**(ГонадотропинИФА-ЛГ)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа Комитета  
по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 8 от 18 сентября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,  
УТВЕРЖДЕННОЙ 17 марта 2000 г.

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

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

**1.2.** ЛГ — гликопротеиновый гормон с молекулярной массой около 30000 Да, состоящий из двух субъединиц — альфа и бета. ЛГ секретируется базофильными клетками передней доли гипофиза.

У мужчин ЛГ стимулирует синтез тестостерона в лейдиговских клетках семенников. У женщин ЛГ, наряду с другими гормонами, участвует в регуляции менструального цикла.

Повышенные уровни ЛГ наблюдаются у пациентов с различными формами гипогонадизма (первичная недостаточность яичников и семенников, поликистоз яичников, менопауза и пр.), а также при почечной недостаточности и циррозе.

При дисфункциях передней доли гипофиза или гипоталамуса наблюдаются пониженные уровни ЛГ, которые могут являться причиной бесплодия у обоих полов.

Кроме того, количественное определение уровня ЛГ в сыворотке крови имеет диагностическое значение при определении менопаузы, точного времени овуляции и мониторинге эндокринной терапии.

**1.3.** Набор «ГонадотропинИФА-ЛГ» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

В наборе «ГонадотропинИФА-ЛГ» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ЛГ. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. 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. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ЛГ-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ЛГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ЛГ в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ЛГ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ЛГ в определяемых образцах.

### **3. СОСТАВ НАБОРА**

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ЛГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ЛГ» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Первому международному референсному препарату 68/40, содержащие известные количества ЛГ; значения концентраций ЛГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ЛГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ЛГ, маркирована «Контрольная сыворотка», 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

### **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

**4.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к b-субъединице ЛГ с хорионическим гонадотропином, фолликулостимулирующим и тиреотропным гормонами.

**4.2. Коэффициент вариации результатов определения ЛГ в одном и том же образце с использованием набора «ГонадотропинИФА-ЛГ» не превышает 8%.**

**4.3. Линейность.** Зависимость концентрации ЛГ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ЛГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет  $\pm 10\%$ .

**4.4. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ЛГ — соответствие измеренной концентрации ЛГ предписанной в пробе, полученной путем

смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

**4.5.** Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ЛГ в сыворотке крови человека не превышает 0,3 мМЕ/мл.

**4.6.** Клиническая проверка. Содержание ЛГ измеряли в сыворотке крови взятой с 9 до 11 часов у 40 здоровых мужчин в возрасте 21–39 лет, 120 здоровых женщин в возрасте 19–35 лет в различных фазах менструального цикла и 15 женщин в возрасте 49–65 лет в постменопаузе. Средняя концентрация ЛГ у мужчин составила 3,9 мМЕ/мл (0,8–8,4 мМЕ/мл). У женщин в фолликулиновой фазе цикла— 4,2 мМЕ/мл (1,1–8,7 мМЕ/мл), в овуляторном пике— 32,0 мМЕ/мл (13,2–72 мМЕ/мл), в лютеиновой фазе цикла— 5,3 мМЕ/мл (0,9–14,4 мМЕ/мл), в постменопаузе— 39,3 мМЕ/мл (18,6–72 мМЕ/мл).

**4.7.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ЛГ, соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**5.3.** При работе с набором следует соблюдать «Правила 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.).

**5.4.** Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**5.5.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**5.6.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

**5.7.** Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

## **6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:**

· спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;

· прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

### **7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.**

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть пробки. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C). Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2. Стрипы.** Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.3. Промывочный буфер.** Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз. Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.4. Конъюгат анти-ЛГ-пероксидаза** готов к использованию.

**7.5. Раствор ТМБ** готов к использованию.

**7.6. Стоп-реагент** готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;  
C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;  
D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;  
E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;  
F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;  
G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;  
H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

**8.3.** Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-ЛГ-пероксидаза.

**8.4.** Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**8.5.** Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

**8.8.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 мин.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину  $B$ — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости  $B$  (ед.опт.плотн.) от концентрации ЛГ в калибровочных пробах (мМЕ/мл).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой  $B-B_T$ , где  $B_T$ — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2. Определить содержание ЛГ в пробах по калибровочному графику.

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду,

что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**9.1.** Набор «ГонадотропинИФА-ЛГ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2... 8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток. Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат анти-ЛГ-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в течение всего срока годности при температуре +2...8°C.

**9.2.** Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

**9.3.** При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

**9.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика, кроме этого рекомендуется определение концентрации ЛГ в контрольной сыворотке.

**9.5.** Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

**9.6.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора «ГонадотропинИФА-ЛГ» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95.**

## **СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п.8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-ЛГ-пероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП № 1, мкл	–	20	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	20	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	20	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	20	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	20	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	20	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	20	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	20
Инкубация № 1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 мин.								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 мин.								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

**Примечание:** КП — калибровочная проба;  
КС — контрольная сыворотка;  
С<sub>х</sub> — анализируемые пробы;  
ОП — оптическая плотность;  
КТ — комнатная температура (+18...25°C).

---

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»:  
зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко  
и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Польшцевым