

«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
ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ГонадотропинИФА-ФСГ)**

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-ФСГ» предназначен для количественного определения концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ФСГ — гликопротеиновый гормон с молекулярной массой около 30 000 Да, состоящий из двух субъединиц — альфа и бета. ФСГ секретируется базофильными клетками передней доли гипофиза.

У мужчин ФСГ, наряду с лютеинизирующим гормоном и тестостероном, необходим для поддержания сперматогенеза в семенных канальцах яичек. У женщин, достигших половой зрелости, ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках.

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

При злокачественных опухолях семенников обычно наблюдаются пониженные уровни ФСГ.

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

1.3. Набор «ГонадотропинИФА-ФСГ» 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 течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

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

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ФСГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ФСГ» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму международному референсному препарату ВОЗ 78/549, содержащие известные количества ФСГ; значения концентраций ФСГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ФСГ-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 ФСГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к b-субъединице ФСГ с хорионическим гонадотропином, лютеинизирующим и тиреотропным гормонами.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения ФСГ в одном и том же образце с использованием набора «Гонадотропин ИФА-ФСГ» не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ФСГ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ФСГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90–110%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ФСГ — соответствие измеренной концентрации ФСГ 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 ФСГ в сыворотке крови человека не превышает 0,3 мМЕ/мл.

4.6. Клиническая проверка. Содержание ФСГ 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 ФСГ у мужчин составила 3,9 мМЕ/мл (1,0–11,8 мМЕ/мл). У женщин в фолликулиновой фазе цикла — 4,6 мМЕ/мл (1,8–11,3 мМЕ/мл), в овуляторном пике — 7,9 мМЕ/мл (4,9–20,4 мМЕ/мл), в лютеиновой фазе цикла — 3,3 мМЕ/мл (1,1–9,5 мМЕ/мл), в постменопаузе — 68,4 мМЕ/мл (31,0–130 мМЕ/мл).

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ФСГ, 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 1Н 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 при 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; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 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 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 (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. Конъюгат анти-ФСГ-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 (+18...25°C). 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, немедленно внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-ФСГ-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

8.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/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 5–10 сек. 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 ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре 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 ТМБ, 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 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 ФСГ 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 ФСГ 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

КП № 1, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
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								

Примечания: КП — калибровочная проба;
КС — контрольная сыворотка;
С_х — анализируемые пробы;
ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°С).

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